

DNA MOLECULES, PREPARATION THEREOF AND USE THEREOF IN GENE THERAPY

Publication number: WO9626270 (A1)

Publication date: 1996-08-29

Inventor(s): CAMERON BEATRICE [FR]; CROUZET JOEL [FR]; DARQUET ANNE-MARIE [FR]; SCHERMAN DANIEL [FR]; WILS PIERRE [FR]

Applicant(s): RHONE POULENC RORER SA [FR]; CAMERON BEATRICE [FR]; CROUZET JOEL [FR]; DARQUET ANNE MARIE [FR]; SCHERMAN DANIEL [FR]; WILS PIERRE [FR]

Classification:

- international: C12N15/09; A61K48/00; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/10; C12N15/85; C12Q1/68; C12R1/19; C12N15/09; A61K48/00; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/10; C12N15/85; C12Q1/68; (IPC1-7): C12N15/10; A61K31/70; A61K48/00; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/70; C12N15/85; C12Q1/68; C12N1/21; C12R1/19

- European: C12N15/10; C12N15/85; C12Q1/68B; C12Q1/68B12

Application number: WO1996FR00274 19960221

Priority number(s): FR19950002117 19950223

Also published as:

- ZA9601484 (A)
- US6143530 (A)
- US6492164 (B1)
- SK114397 (A3)
- NO973838 (A)

[more >>](#)

Cited documents:

- WO9409127 (A2)
- US5227288 (A)
- EP0300422 (A2)
- EP0350341 (A1)
- WO9605297 (A1)

[more >>](#)

Abstract of WO 9626270 (A1)

Double-stranded DNA molecules characterised in that they are circular and in that they essentially include one or more genes of interest.

Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAÎTE DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/10, 15/70, 15/85, 5/10, 1/21, C12Q 1/68, A61K 31/70, 48/00 // (C12N 1/21, C12R 1:19)		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/26270 (43) Date de publication internationale: 29 août 1996 (29.08.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00274			(81) Etats désignés: AL, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(22) Date de dépôt international: 21 février 1996 (21.02.96)			
(30) Données relatives à la priorité: 95/02117 23 février 1995 (23.02.95) FR			
(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).			Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(72) Inventeurs; et			
(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): CAMERON, Béatrice [FR/FR]; 6, rue Tournefort, F-75005 Paris (FR). CROUZET, Joël [FR/FR]; 12, rue Michel-Voisin, F-92330 Sceaux (FR). DARQUET, Anne-Marie [FR/FR]; 36, rue Jules-Lagaisse, F-94400 Vitry-sur-Seine (FR). SCHERMAN, Daniel [FR/FR]; 50, rue du Disque, F-75645 Paris Cédex 13 (FR). WILS, Pierre [FR/FR]; 36, rue de Montmorency, F-75003 Paris (FR).			
(74) Mandataire: LE COUPANEC, Pascale; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).			
(54) Title: DNA MOLECULES, PREPARATION THEREOF AND USE THEREOF IN GENE THERAPY			
(54) Titre: MOLECULES D'ADN, PREPARATION ET UTILISATION EN THERAPIE GENIQUE			
(57) Abstract			
Double-stranded DNA molecules characterised in that they are circular and in that they essentially include one or more genes of interest.			
(57) Abrégé			
La présente invention concerne des molécules d'ADN double brin caractérisées en ce qu'elles sont sous forme circulaire, et en ce qu'elles comprennent essentiellement un ou plusieurs gènes d'intérêt.			
<p style="text-align: center;">  Gene d'intérêt GENE OF INTEREST </p> <p style="text-align: center;">  Séquence Ligand-spécifique LIGAND-SPECIFIC SEQUENCE </p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Liberia	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

MOLÉCULES D'ADN, PRÉPARATION ET UTILISATION EN
THÉRAPIE GÉNIQUE

La thérapie génique consiste à corriger une déficience ou une anomalie en introduisant une information génétique dans la cellule ou l'organe affecté. Cette 5 information peut être introduite soit *in vitro* dans une cellule extraite de l'organe et ensuite réinjectée dans l'organisme, soit *in vivo*, directement dans le tissu visé. S'agissant d'une molécule de haut poids moléculaire et de charge négative, l'ADN a des difficultés pour traverser spontanément les membranes cellulaires phospholipidiques. Différents vecteurs sont donc utilisés afin de permettre le transfert de gène : les 10 vecteurs viraux d'une part, les vecteurs chimiques et/ou biochimiques, naturels ou synthétiques, d'autre part. Les vecteurs viraux (rétrovirus, adénovirus, virus adéno-associés,...) sont très efficaces, notamment pour le passage des membranes, mais présentent un certain nombre de risques tels que la pathogénicité, la recombinaison, la réplication, l'immunogénicité, ... Les vecteurs chimiques et/ou biochimiques permettent 15 d'éviter ces risques (pour revues, voir Behr, 1993, Cotten et Wagner, 1993). Ce sont par exemple des cations (phosphate de calcium, DEAE-dextran,...) qui agissent en formant des précipités avec l'ADN, lesquels peuvent être "phagocytés" par les cellules. Il peut également s'agir de liposomes dans lesquels l'ADN est incorporé et qui fusionnent avec la membrane plasmique. Les vecteurs synthétiques de transfert de 20 gènes sont généralement des lipides ou des polymères cationiques qui complexent l'ADN et forment avec lui une particule portant des charges positives en surface. Ces particules sont capables d'interagir avec les charges négatives de la membrane cellulaire, puis de franchir celle-ci. On peut citer comme exemples de tels vecteurs le dioctadécylamidoglycylspermine (DOGS, TransfectamTM) ou le chlorure de N-[1- 25 (2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium (DOTMA, LipofectinTM). Des protéines chimères ont aussi été développées : elles sont constituées d'une partie polycationique qui condense l'ADN, liée à un ligand qui se fixe sur un récepteur membranaire et entraîne le complexe dans les cellules par endocytose. Il est ainsi théoriquement possible de "cibler" un tissu ou certaines populations cellulaires, afin 30 d'améliorer la biodisponibilité *in vivo* du gène transféré.

Toutefois, l'utilisation de vecteurs chimiques et/ou biochimiques ou d'ADN nu implique la possibilité de produire des quantités importantes d'ADN de pureté pharmacologique. En effet, dans ces techniques de thérapie génique, le médicament est constitué par l'ADN même et il est essentiel de pouvoir fabriquer, dans des quantités adaptées, des ADN ayant des propriétés appropriées à un usage thérapeutique chez 5 l'homme.

Les plasmides utilisés actuellement en thérapie génique portent (i) une origine de réPLICATION, (ii) un gène marqueur tel qu'un gène de résistance à un antibiotique (kanamycine, ampicilline...) et (iii) un ou plusieurs transgènes avec des séquences nécessaires à leur expression (enhanceur(s), promoteur(s), séquences de 10 polyadénylation...). Ces plasmides, utilisés actuellement en thérapie génique (au niveau d'essais cliniques tels que le traitement de mélanomes, Nabel et al., 1992, ou au niveau d'études expérimentales), présentent cependant certains inconvénients, liés notamment à leur dissémination dans l'organisme. Ainsi, en raison de cette dissémination, une 15 bactérie compétente présente dans l'organisme peut, à une fréquence faible, recevoir ce plasmide. Ceci a d'autant plus de chances de se passer qu'il s'agit d'un traitement de thérapie génique *in vivo* dans lequel l'ADN peut être disséminé dans l'organisme du patient et peut se trouver au contact de bactéries qui infectent ce patient ou bien de bactéries de la flore commensale. Si la bactérie receveuse du plasmide est une 20 entérobactérie, telle qu'*E. coli*, ce plasmide peut se répliquer. Un tel événement conduit alors à la dissémination du gène thérapeutique. Dans la mesure où les gènes thérapeutiques utilisés dans des traitements de thérapie génique peuvent coder par exemple pour une lymphokine, un facteur de croissance, un antioncogène, ou une protéine dont la fonction fait défaut chez l'hôte et permet donc de corriger un défaut 25 génétique, la dissémination de certains de ces gènes pourrait avoir des effets imprévisibles et préoccupants (par exemple si une bactérie pathogène acquérait le gène d'un facteur de croissance humain). De plus, les plasmides utilisés en thérapie génique non virale possèdent aussi un marqueur de résistance à un antibiotique (ampicilline, kanamycine...). La bactérie acquérant un tel plasmide a donc un avantage sélectif 30 indéniable puisque tout traitement antibiothérapeutique, utilisant un antibiotique de la même famille que celui sélectionnant le gène de résistance du plasmide, va conduire à

la sélection du plasmide en question. A cet égard, l'ampicilline fait partie des β -lactames qui est la famille d'antibiotiques les plus utilisés au monde. Il est donc nécessaire de chercher à limiter au maximum la dissémination des gènes thérapeutiques et des gènes de résistance. Par ailleurs, les gènes portés par le plasmide, 5 correspondants à la partie vecteur du plasmide (fonction(s) nécessaires(s) à la réPLICATION, gène de résistance) risquent également d'être exprimés dans les cellules transfectées. Il existe en effet un bruit de fond de transcription, que l'on ne peut exclure, dû aux signaux d'expression de l'hôte sur le plasmide. Cette expression de protéines exogènes peut être tout à fait préjudiciable dans un certain nombre de 10 traitements de thérapie génique, du fait de leur immunogénicité potentielle et donc de l'attaque par le système immunitaire des cellules transfectées.

Il est donc particulièrement important de pouvoir disposer de molécules d'ADN médicamenteux ayant une pureté génétique appropriée à un usage thérapeutique. Il est également particulièrement important de disposer de méthodes permettant de préparer 15 ces molécules d'ADN dans des quantités adaptées à un usage pharmaceutique. La présente invention apporte une solution à ces problèmes.

La présente invention décrit en effet des molécules d'ADN, utilisables en thérapie génique, ayant une pureté génétique très améliorée et de grandes propriétés de biodisponibilité. L'invention décrit également une méthode particulièrement efficace 20 pour la préparation de ces molécules, et pour leur purification.

La présente invention réside notamment dans la mise au point de molécules d'ADN utilisables en thérapie génique, pratiquement dépourvues de toute région non-thérapeutique. Les molécules d'ADN selon l'invention, également désignées minicercles en raison de leur structure circulaire, de leur taille réduite et de leur forme 25 superenroulée, présentent de nombreux avantages.

Elles permettent tout d'abord d'éliminer les risques liés à la dissémination du plasmide, tels que (1) la réPLICATION et la dissémination, pouvant entraîner une surexpression non contrôlée du gène thérapeutique, (2) la dissémination et l'expression de gènes de résistance, (3) l'expression de gènes présents dans la partie non-

thérapeutique du plasmide, potentiellement immunogènes et/ou inflammatoires, etc. L'information génétique contenue dans les molécules d'ADN selon l'invention se limite en effet essentiellement au(x) gène(s) thérapeutique(s) et aux signaux de régulation de son (leur) expression (ni origine de réPLICATION, ni gène de résistance à un antibiotique, etc). La probabilité que ces molécules (et donc l'information génétique qu'elles contiennent) soient transférées à un microorganisme, et maintenues de manière stable, est quasiment nulle.

De plus, en raison de leur taille réduite, les molécules d'ADN selon l'invention ont potentiellement une meilleure biodisponibilité in vivo. En particulier, elles présentent des capacités de pénétration et de distribution cellulaires améliorées. Ainsi, il est reconnu que le coefficient de diffusion dans les tissus est inversement proportionnel au poids moléculaire (Jain, 1987). De même, au niveau cellulaire, les molécules de haut poids moléculaire ont une moins bonne perméabilité à travers la membrane plasmique. En outre, pour le passage du plasmide au noyau, indispensable à son expression, le poids moléculaire élevé est également un inconvénient, les pores nucléaires imposant une limite de taille pour la diffusion vers le noyau (Landford *et al.*, 1986). L'élimination des parties non-thérapeutiques du plasmide (origine de réPLICATION et gène de résistance notamment) selon l'invention permet également de diminuer la taille des molécules d'ADN. Cette diminution peut être estimée à un facteur 2, en comptant par exemple 3 kb pour l'origine de réPLICATION et le marqueur de résistance (partie vecteur) et 3 kb pour le transgène avec les séquences nécessaires à son expression. Cette diminution (i) de poids moléculaire et (ii) de charge négative, confère aux molécules de l'invention des capacités améliorées de diffusion et de biodisponibilité tissulaires, cellulaires et nucléaires.

Un premier objet de l'invention réside donc dans une molécule d'ADN double brin ayant les caractéristiques suivantes : elle est sous forme circulaire, et elle comprend essentiellement un ou plusieurs gènes d'intérêt. Comme indiqué ci-dessus, les molécules de l'invention sont essentiellement dépourvues de régions non-thérapeutiques, et en particulier d'origine de réPLICATION et/ou de gène marqueur. En outre, elles se présentent avantageusement sous forme superenroulée.

La présente invention découle également de la mise au point d'un procédé, de constructions et d'hôtes cellulaires spécifiques, particulièrement efficaces pour la production de ces molécules d'ADN thérapeutiques. Plus particulièrement, le procédé selon l'invention réside dans la production des molécules d'ADN thérapeutiques 5 définies ci-dessus par excision à partir d'un plasmide ou d'un chromosome par recombinaison site-spécifique. Le procédé selon l'invention est particulièrement avantageux puisqu'il ne nécessite pas d'étape de purification préalable du plasmide, est très spécifique, particulièrement efficace, ne diminue pas les quantités d'ADN produites et conduit directement à des molécules thérapeutiques d'une très grande pureté 10 génétique et d'une grande biodisponibilité. Ce procédé conduit en effet à la génération de molécules d'ADN circulaires (minicercles) contenant essentiellement le gène d'intérêt et les séquences régulatrices permettant son expression dans les cellules, le tissu, l'organe, ou l'appareil, ou même l'organisme entier où l'expression est souhaitée. En outre, ces molécules peuvent ensuite être purifiées par des techniques classiques.

15 La recombinaison site-spécifique peut être réalisée grâce à divers systèmes qui entraînent la recombinaison site-spécifique entre des séquences. Plus préférentiellement, la recombinaison site-spécifique dans le procédé de l'invention est obtenue au moyen de deux séquences spécifiques qui sont capables de recombiner entre elles en présence d'une protéine spécifique, généralement désignée recombinase. 20 Pour cette raison, les molécules d'ADN selon l'invention comprennent généralement en outre une séquence résultant de cette recombinaison site spécifique. Les séquences permettant la recombinaison utilisées dans le cadre de l'invention comprennent généralement de 5 à 100 paires de bases, et, plus préférentiellement, moins de 50 paires de bases.

25 La recombinaison site-spécifique peut être réalisée in vivo (c'est à dire dans la cellule hôte) ou in vitro (c'est à dire sur une préparation de plasmide).

A cet égard, la présente invention fournit également des constructions génétiques particulières appropriées à la production des molécules d'ADN thérapeutiques définies ci-dessus. Ces constructions génétiques, ou ADN recombinants 30 selon l'invention comprennent notamment le ou les gènes d'intérêt encadré(s) par les

deux séquences permettant la recombinaison site-spécifique positionnées en orientation directe. La position en orientation directe indique que les deux séquences suivent la même polarité 5'-3' dans l'ADN recombinant selon l'invention. Les constructions génétiques de l'invention peuvent être des fragments d'ADN double-brin (cassettes) composées essentiellement des éléments indiqués ci-dessus. Ces cassettes sont utilisables pour la construction d'hôtes cellulaires ayant ces éléments intégrés dans leur génome (figure 1). Les constructions génétiques de l'invention peuvent également être des plasmides, c'est-à-dire toute molécule d'ADN, linéaire ou circulaire, capable de se répliquer dans une cellule hôte donnée, comportant le ou les gènes d'intérêt encadré(s) par les deux séquences permettant la recombinaison site-spécifique positionnées en orientation directe. Il peut s'agir plus précisément d'un vecteur (tel qu'un vecteur de clonage et/ou d'expression), d'un phage, d'un virus, etc. Ces plasmides de l'invention peuvent être utilisés pour transformer tout hôte cellulaire compétent en vue de la production des minicercles par réPLICATION du plasmide puis 10 excision du minicercle (figure 2).

A cet égard, un autre objet de l'invention réside dans un ADN recombinant comprenant un ou plusieurs gènes d'intérêt encadrés par deux séquences permettant la recombinaison site-spécifique, positionnées en orientation directe.

L'ADN recombinant selon l'invention est préférentiellement un plasmide 20 comprenant au moins :

- a) une origine de réPLICATION et éventuellement un gène marqueur,
- b) deux séquences permettant une recombinaison site-spécifique positionnées en orientation directe, et,
- c) placés entre lesdites séquences b), un ou plusieurs gènes d'intérêt.

25 Le système de recombinaison spécifique présent dans les constructions génétiques selon l'invention peut être de différentes origines. En particulier, les séquences spécifiques et les recombinases utilisées peuvent appartenir à différentes classes structurales, et notamment à la famille de l'intégrase du bactériophage λ ou à la famille de la résolvase du transposon Tn3.

Parmi les recombinases appartenant à la famille de l'intégrase du bactériophage λ , on peut citer notamment l'intégrase des phages lambda (Landy *et al.*, Science 197 (1977) 1147), P22 et Φ 80 (Leong *et al.*, J. Biol. Chem. 260 (1985) 4468), HP1 de Haemophilus influenzae (Hauser *et al.*, J. Biol. Chem. 267 (1992) 6859), l'intégrase 5 Cre du phage P1, l'intégrase du plasmide pSAM2 (EP 350 341) ou encore la FLP recombinase du plasmide 2 μ . Lorsque les molécules d'ADN selon l'invention sont préparées par recombinaison au moyen d'un système site spécifique de la famille de l'intégrase du bactériophage lambda, les molécules d'ADN selon l'invention comprennent généralement en outre une séquence résultant de la recombinaison entre 10 deux séquences d'attachement att du bactériophage ou plasmide correspondant.

Parmi les recombinases appartenant à la famille du transposon Tn3, on peut citer notamment la résolvase du transposon Tn3 ou des transposons , Tn21 et Tn522 (Stark *et al.*, 1992) ; l'invertase Gin du bactériophage mu ou encore la résolvase de plasmides, telle que celle du fragment par de RP4 (Abert *et al.*, Mol. Microbiol. 12 15 (1994) 131). Lorsque les molécules d'ADN selon l'invention sont préparées par recombinaison au moyen d'un système site spécifique de la famille du transposon Tn3, les molécules d'ADN selon l'invention comprennent généralement en outre une séquence résultant de la recombinaison entre deux séquences de reconnaissance de la résolvase du transposon considéré.

20 Selon un mode de réalisation particulier, dans les constructions génétiques de la présente invention, les séquences permettant la recombinaison site-spécifique sont dérivées d'un bactériophage. Plus préférentiellement, il s'agit des séquences d'attachement (séquences attP et attB) d'un bactériophage ou de séquences dérivées. Ces séquences sont capables de recombiner spécifiquement entre-elles en présence 25 d'une recombinase désignée intégrase. Le terme séquence dérivée inclut les séquences obtenues par modification(s) des séquences d'attachement des bactériophages, conservant la capacité de recombiner spécifiquement en présence de la recombinase appropriée. Ainsi, il peut s'agir de fragments réduits de ces séquences ou au contraire étendus par addition d'autres séquences (sites de restriction, etc). Il peut également 30 s'agir de variants obtenus par mutation(s), notamment par mutation(s) ponctuelle(s).

On désigne selon l'invention par séquences attP et attB d'un bactériophage ou d'un plasmide les séquences du système de recombinaison spécifique dudit bactériophage ou plasmide, c'est-à-dire la séquence attP présente dans ledite phage ou plasmide et la séquence attB chromosomique correspondante.

5 A titre d'exemples préférés, on peut citer notamment les séquences d'attachement des phages lambda, P22, Φ80, P1, HP1 de Haemophilus influenzae ou encore du plasmide pSAM2, ou 2 μ. Ces séquences sont avantageusement choisies parmi tout ou partie des séquences SEQ ID n° 1, SEQ ID n° 2, SEQ ID n° 6, SEQ ID n° 7, SEQ ID n° 8, SEQ ID n° 9, SEQ ID n° 10, SEQ ID n° 11, SEQ ID n° 12, SEQ ID n° 13 et SEQ ID n° 14. Ces séquences comprennent notamment la région centrale homologue des séquences d'attachement de ces phages.

10

A cet égard, un plasmide préféré selon la présente invention comprend :

- (a) une origine de réPLICATION bactérienne et éventuellement un gène marqueur,
- (b) les séquences attP et attB d'un bactériophage sélectionné parmi les phages lambda, P22, Φ80, HP1, P1 ou du plasmide pSAM2 ou 2μ ou des séquences dérivées; et,
- (c) placés entre lesdites séquences b), un ou plusieurs gènes d'intérêt.

Selon un mode particulièrement préféré de mise en œuvre, il s'agit des séquences d'attachement (attP et attB) du phage lambda. Des plasmides portant ces séquences sont notamment les plasmides pXL2648, pXL2649 ou pXL2650. Lorsque 20 ces plasmides sont mis, in vivo ou in vitro, en présence de l'intégrase du phage lambda, les séquences recombinent entre elles pour générer in vivo ou in vitro, par excision, un minicercle selon l'invention comprenant essentiellement les éléments (c), c'est-à-dire la partie thérapeutique (figure 2).

25 Toujours selon un mode particulier de réalisation de l'invention, les séquences permettant la recombinaison site-spécifique sont dérivées de la région loxP du phage P1. Cette région se compose essentiellement de deux séquences répétées inversées capables de recombiner spécifiquement entre-elles en présence d'une protéine,

désignée Cre (Sternberg et al., J. Mol. Biol. 150 (1971) 467). Dans une variante particulière, l'invention concerne donc un plasmide comprenant (a) une origine de réPLICATION bactérienne et éventuellement un gène marqueur; (b) les séquences répétées inversées du bactériophage P1 (région loxP); et (c), placés entre lesdites séquences b),
5 un ou plusieurs gènes d'intérêt.

Selon un autre mode de réalisation particulier, dans les constructions génétiques de la présente invention, les séquences permettant la recombinaison site-spécifique sont dérivées d'un transposon. Plus préférentiellement, il s'agit des séquences de reconnaissance de la résolvase d'un transposon ou de séquences dérivées.
10 A titre d'exemples préférés, on peut citer notamment les séquences de reconnaissance des transposons Tn3, , Tn21 et Tn522. A titre d'exemple préféré, on peut citer la séquence SEQ ID n° 15 ou un dérivé de celle-ci (voir également Sherratt, P. 163-184, Mobile DNA, Ed. D. Berg and M. Howe, American Society for Microbiology, Washington D.C. 1989).

15 Selon une autre variante particulièrement avantageuse, les plasmides de l'invention comprennent en outre une sequence de resolution des multimeres. Il s'agit préferentiellement de la séquence mrs (multimer resolution system) du plasmide RK2. Plus préferentiellement, l'invention concerne un plasmide comprenant :

- (a) une origine de réPLICATION bactérienne et éventuellement un gène marqueur,
- 20 (b) les séquences attP et attB d'un bactériophage en orientation directe, sélectionné parmi les phages lambda, P22, Φ 80, HP1, P1 ou du plasmide pSAM2 ou 2μ ou des séquences dérivées; et,
- (c) placés entre lesdites séquences b), un ou plusieurs gènes d'intérêt et la séquence mrs du plasmide RK2.

25 Ce mode de réalisation est particulièrement avantageux. Ainsi, lorsque les plasmides pXL2649 ou pXL2650 sont mis en présence de l'intégrase du bactériophage *in vivo* les séquences recombinent pour générer le minicercle et le miniplasmide mais aussi des formes multimères ou topologiques de minicercle ou de miniplasmide. Il est

particulièrement avantageux de pouvoir diminuer la concentration de ces formes pour augmenter la production et faciliter la purification de minicercle.

Les formes multimériques de plasmides sont connues de l'homme de l'art. Par exemple le fragment cer de ColE1 (Summers et coll. 1984 Cell 36 p1097) ou le site mrs du locus par de RK2 (L. Ebert 1994 Mol. Microbiol. 2 p131) permettent la résolution de multimères de plasmides et participent à une stabilité accrue du plasmide. Mais alors que la résolution au site cer nécessite quatre protéines codées par le génome de E. coli (Colloms et coll. 1990 J. Bacteriol. 172 p6973), la résolution au site mrs ne nécessite que la protéine ParA dont le gène parA est cartographié sur le locus par de RK2. A ce titre, il semble avantageux d'utiliser tout ou une partie du locus par contenant parA et la séquence mrs. Par exemple, la séquence mrs peut être placée entre les séquences attB et attP du phage lambda et le gène parA être exprimé en trans ou en cis à partir de son propre promoteur ou d'un promoteur inductible. A cet égard, un plasmide particulier de l'invention comprend :

15 (a) une origine de réPLICATION bactérienne et éventuellement un gène marqueur,

 (b) les séquences attP et attB d'un bactériophage en orientation directe, sélectionné parmi les phages lambda, P22, Φ80, HP1, P1 ou du plasmide pSAM2 ou 2μ ou des séquences dérivées,

 (c) placés entre lesdites séquences b), un ou plusieurs gènes d'intérêt et la 20 séquence mrs du plasmide RK2, et,

 (d) le gene parA du plasmide RK2.

Un tel plasmide est notamment le plasmide pXL2960 décrit dans les exemples. Il peut être mis en oeuvre et permettre la production de minicercle sous forme monomérique uniquement.

25 Selon une autre variante avantageuse, les plasmides de l'invention comprennent deux jeux de séquences de recombinaison site-spécifique, d'une famille différente. Il s'agit avantageusement d'un premier jeu de séquences integrase-dépendantes et d'un second jeu de séquences parA-dépendantes. L'utilisation de deux jeux de séquences

permet d'augmenter les rendements de production de minicercles, lorsque la première recombinaison site-spécifique est incomplète. Ainsi, lorsque les plasmides pXL2650 ou pXL2960 sont mis en présence de l'intégrase du bactériophage *in vivo*, les séquences recombinent pour générer le miniplasmide et le minicercle mais cette réaction n'est pas totale (il peut subsister 5 à 10 % de plasmide initial). L'introduction, à proximité de chacune des séquences *att* du phage lambda, d'une séquence mrs de RK2 permet d'augmenter la production de minicercles. Ainsi, après induction de l'intégrase du phage lambda et recombinaison Int-dépendante, les molécules non recombinées pourront être prise en charge par la protéine ParA de RK2 et pourront recombiner aux sites mrs. Inversement, après induction de la protéine ParA et recombinaison ParA-dépendante, les molécules non recombinées pourront être prise en charge par l'intégrase du phage lambda et pourront recombiner aux sites *att*. De telles constructions permettent ainsi de produire du minicercle et des quantités négligeables de molécules non recombinées. Les séquences *att*, de même que les séquences mrs sont en orientation directe, et les gènes *int* et *parA* peuvent être induits simultanément ou successivement à partir du même promoteur inductible ou de deux promoteurs inductibles. Préférentiellement, il s'agit des séquences d'attachement *attB* et *attP* du phage lambda en orientation directe et de deux séquences mrs de RK2 en orientation directe.

Comme indiqué précédemment, un autre aspect de la présente invention réside dans un procédé de production de molécules d'ADN thérapeutiques définies ci-avant par excision, à partir d'un plasmide ou d'un chromosome, par recombinaison site-spécifique.

Un autre objet de la présente invention réside donc dans un procédé de production d'une molécule d'ADN (minicercle) telle que définie ci-avant selon lequel une culture de cellules hôtes contenant un ADN recombinant tel que défini ci-avant est mise en contact avec la recombinase permettant d'induire la recombinaison site-spécifique. Plus préférentiellement, la mise en contact est effectuée soit par transfection ou infection avec un plasmide ou un phage contenant le gène de la dite recombinase; soit par induction de l'expression d'un gène codant pour la dite

recombinase, présent dans la cellule hôte. Comme indiqué ci-après, ce gène peut être présent dans la cellule hôte sous une forme intégrée au génome, sur un plasmide réplicatif ou encore sur le plasmide de l'invention, dans la partie non-thérapeutique.

Pour permettre la production des minicercles selon l'invention par 5 recombinaison site-spécifique in vivo, la recombinase utilisée doit être introduite ou induite dans les cellules ou le milieu de culture au moment déterminé. Pour cela, différentes méthodes peuvent être utilisées. Selon une première méthode, on utilise une cellule hôte contenant le gène de la recombinase sous une forme permettant son expression régulée. Il peut notamment être introduit sous contrôle d'un promoteur ou 10 d'un système de promoteurs inductibles, ou encore dans un système thermosensible. En particulier, le gène peut être présent dans un phage thermosensible, latent pendant la phase de croissance, et induit à température appropriée (exemple phage lysogène lambda Xis- cI857). La cassette d'expression du gène de la recombinase peut être portée par un plasmide, un phage, ou même par le plasmide de l'invention, dans la 15 région non-thérapeutique. Elle peut être intégrée au génome de la cellule hôte ou maintenue sous forme réplicative. Selon une autre méthode, la cassette d'expression du gène est portée par un plasmide ou un phage utilisé pour transfecter ou infecter la culture cellulaire après la phase de croissance. Dans ce cas, il n'est pas nécessaire que le gène soit sous une forme permettant son expression régulée. En particulier, tout 20 promoteur constitutif peut être utilisé. La mise en contact avec la recombinase peut également être réalisée in vitro, sur un préparation de plasmide, par incubation directe avec la protéine.

Préférentiellement, on utilise dans le cadre de la présente invention une cellule hôte capable d'exprimer de manière régulée le gène de la recombinase. Ce mode de 25 mise en oeuvre, dans lequel la recombinase est fournie directement par la cellule hôte après induction, est particulièrement avantageux. En effet, il suffit simplement de placer, au moment voulu, les cellules en culture dans les conditions d'expression du gène de la recombinase (température permissive pour gène thermosensible, ajout d'un inducteur pour promoteur régulable, etc) pour induire la recombinaison site-spécifique 30 in vivo et ainsi l'excision du minicercle de l'invention. En outre, cette excision se fait

avec des rendements particulièrement élevés puisque toutes les cellules en culture expriment la recombinase, ce qui n'est pas nécessairement le cas si une transfection ou une infection doivent être réalisées pour transférer le gène de la recombinase.

Selon un premier mode de réalisation, le procédé de l'invention comprend
5 l'excision des molécules d'ADN thérapeutique par recombinaison site-spécifique à partir d'un plasmide. Ce mode de réalisation met en oeuvre les plasmides décrits ci-avant permettant, dans un premier temps, la réPLICATION chez un hôte choisi puis, dans un second temps, l'excision des parties non-thérapeutiques du dit plasmide (notamment l'origine de réPLICATION et le gène de résistance) par recombinaison site-
10 spécifique, générant les molécules d'ADN circulaires de l'invention. Pour la mise en oeuvre du procédé, différents types de plasmides peuvent être utilisés et en particulier un vecteur, un phage ou un virus. Il s'agit préférentiellement d'un vecteur réPLICATIF.

Avantageusement, le procédé de l'invention comprend une étape préalable de transformation de cellules hôtes avec un plasmide tel que défini précédemment, puis de
15 culture des cellules transformées, permettant d'obtenir des quantités appropriées de plasmide. L'excision par recombinaisons site-spécifique est alors réalisée par mise en contact avec la recombinase dans les conditions définies ci-avant (figure 2). Comme indiqué précédemment, dans ce mode de réalisation, la recombinaison site-spécifique peut être réalisée in vivo. (c'est-à-dire dans la cellule hôte) ou in vitro (c'est-à-dire sur
20 une préparation de plasmide).

Selon un mode préféré, les molécules d'ADN de l'invention sont donc obtenues à partir d'un vecteur réPLICATIF, par excision de la partie non-thérapeutique portant notamment l'origine de réPLICATION et le gène marqueur par recombinaison site-spécifique.

25 Selon un autre mode de réalisation, le procédé de l'invention comprend l'excision des molécules d'ADN à partir du génome de l'hôte cellulaire par recombinaison site-spécifique. Ce mode de réalisation repose plus particulièrement sur la construction d'hôtes cellulaires comprenant, inséré dans leur génome, une ou plusieurs copies d'une cassette comprenant le gène d'intérêt encadré par les séquences

permettant la recombinaison (figure 1). Différentes techniques peuvent être utilisées pour l'insertion de la cassette de l'invention dans le génome de la cellule hôte. En particulier, l'insertion en plusieurs endroits distincts du génome peut être obtenue en utilisant des vecteurs intégratifs. A cet égard, différents systèmes de transposition tels que notamment le système miniMu ou les transposons défectifs tels que des dérivés de Tn10 par exemple peuvent être utilisés (Kleckner *et al.*, Methods Enzymol. 204 (1991) 139; Groisman E., Methods Enzymol. 204 (1991) 180). L'insertion peut également être réalisée par recombinaison homologue, permettant d'intégrer dans le génome de la bactérie une cassette contenant deux séquences de recombinaison en orientation directe encadrant un ou plusieurs gènes d'intérêt. Ce processus peut en outre être reproduit autant de fois que désiré de manière à avoir un nombre de copies le plus important possible par cellule. Une autre technique consiste encore à utiliser un système d'amplification *in vivo* utilisant la recombinaison tel que décrit dans Labarre *et al.* (Labarre J., O. Reyes, Guyonvach, and G. Leblon. 1993. Gene replacement, integration, and amplification at the *gdhA* locus of *Corynebacterium glutamicum*. J. Bacteriol. 175:1001-107) de manière à passer d'une copie de la cassette à un nombre beaucoup plus important.

Une technique préférée consiste dans l'utilisation de miniMu. Des dérivés de miniMu sont construits à cet effet comprenant un marqueur de résistance, les fonctions nécessaires en *cis* à leur transposition et une cassette contenant deux séquences de recombinaison en orientation directe encadrant le ou les gènes d'intérêt. Ces miniMu sont avantageusement placées en plusieurs endroits du génome en utilisant un marqueur de résistance (la kanamycine, par exemple) permettant de sélectionner plusieurs copies par génome (Groisman E. précitée). Comme décrit ci-dessus, la cellule hôte en question peut aussi exprimer de manière inductible une recombinase site spécifique conduisant à l'excision du fragment bordé par les séquences de recombinaison en orientation directe. Après excision les minicercles peuvent être purifiés par les techniques classiques.

Ce mode de mise en oeuvre du procédé de l'invention est particulièrement intéressant puisqu'il conduit à la génération d'un seul type de molécule plasmidique : le

minicercle de l'invention. Les cellules ne contiennent en effet aucun autre plasmide episomal comme c'est le cas lors de la production à partir d'un plasmide (figures 1 et 2).

Un autre objet de l'invention réside également dans une cellule hôte modifiée 5 comprenant, inséré dans son génome, une ou plusieurs copies d'un ADN recombinant tel que défini ci-avant.

L'invention concerne également toute cellule recombinante contenant un plasmide tel que défini ci-avant. Ces cellules sont obtenues par toute technique connue de l'homme du métier permettant l'introduction d'un ADN dans une cellule donnée. Il 10 peut s'agir notamment de transformation, électroporation, conjugaison, fusion de protoplastes ou toute autre technique connue de l'homme de l'art. S'agissant de la transformation, différents protocoles ont été décrits dans l'art antérieur. En particulier, la transformation de cellules peut être réalisée en traitant les cellules entières en présence d'acétate de lithium et de polyéthylène glycol selon la technique décrite par 15 Ito et al. (*J. Bacteriol.* 153 (1983) 163-168), ou en présence d'éthylène glycol et de diméthylsulfoxyde selon la technique de Durrens et al. (*Curr. Genet.* 18 (1990) 7). Un protocole alternatif a également été décrit dans la demande de brevet EP 361 991. S'agissant d'électroporation, elle peut être réalisée selon Becker et Guarente (in : Methods in Enzymology Vol194 (1991) 182).

20 Le procédé selon l'invention peut être réalisé dans tout type d'hôte cellulaire. En particulier, il peut s'agir de bactéries ou de cellules eucaryotes (levures, cellules animales, cellules végétales) etc. Parmi les bactéries, on peut citer plus préférentiellement E.coli, B. subtilis, Streptomyces, Pseudomonas (P. putida, P. aeruginosa), Rhizobium meliloti, Agrobacterium tumefaciens, Staphylococcus aureus, 25 Streptomyces pristinaespiralis, Enterococcus faecium ou Clostridium, etc. Parmi les bactéries, on préfère utiliser E. coli. Parmi les levures, on peut citer Kluyveromyces, Saccharomyces, Pichia, Hansenula, etc. Parmi les cellules animales de mammifères, on peut citer les cellules CHO, COS, NIH3T3, etc.

En fonction de l'hôte utilisé, le plasmide selon l'invention est adapté par l'homme du métier pour permettre sa réPLICATION. En particulier, l'origine de réPLICATION et le gène marqueur sont choisis en fonction de la cellule hôte selectionnée.

Le gène marqueur peut être un gène de résistance, notamment à un antibiotique 5 (ampicilline, kanamycine, généticine, hygromycine, etc), ou tout gène conférant à la cellule une fonction qu'elle ne possède plus (par exemple un gène qui a été déléte sur le chromosome ou rendu inactif), le gène sur le plasmide rétablissant cette fonction.

Dans un mode de réalisation particulier, le procédé de l'invention comprend une étape supplémentaire de purification du minicercle.

10 A cet égard, le minicercle peut être purifié par les techniques classiques de purification d'ADN plasmidique puisqu'il est superenroulé comme de l'ADN plasmidique. Ces techniques comprennent, entre autre, la purification sur gradient de densité en chlorure de césium, en présence de bromure d'éthidium, ou bien l'utilisation de colonnes d'échange d'anions (Maniatis *et al.*, 1989). En outre si l'on estime que 15 l'ADN plasmidique correspondant aux parties non-thérapeutiques (origine de réPLICATION et marqueur de sélection notamment) est présent en quantité trop importante, il est également possible, après ou avant la purification, d'utiliser une ou plusieurs enzymes de restriction qui digéreront le plasmide et pas le minicercle, ce qui permet de les séparer par des techniques séparant l'ADN superenroulé de l'ADN linéaire, telles que un gradient de densité en chlorure de césium, en présence de 20 bromure d'éthidium (Maniatis *et al.*, 1989).

En outre, la présente invention décrit également un procédé amélioré pour la purification des minicercles. Ce procédé permet, en une seule étape, d'obtenir des minicercles de très grande pureté avec des rendements importants. Ce procédé 25 amélioré est basé sur l'interaction entre une séquence double-brin présente sur le minicercle et un ligand spécifique. Le ligand peut être de nature diverse et notamment de nature protéique, chimique ou nucléique. Il s'agit préférentiellement d'un ligand de type acide nucléique, et notamment d'un oligonucléotide, éventuellement modifié chimiquement, capable de former par hybridation une triple-hélice avec la séquence

spécifique présente sur la molécule d'ADN de l'invention. Il a en effet été montré que certains oligonucléotides étaient capables de former spécifiquement des triple-hélices avec des séquences d'ADN double-brin (Hélène et al., Biochim. Biophys. Acta 1049 (1990) 99; voir également FR94 15162 incorporée à la présente par référence).

5 Dans une variante particulièrement avantageuse, les molécules d'ADN de l'invention contiennent donc en outre une séquence capable d'interagir spécifiquement avec un ligand (figure 3). De manière préférentielle, il s'agit d'une séquence capable de former, par hybridation, une triple-hélice avec un oligonucléotide spécifique. Cette séquence peut être positionnée en tout site de la molécule d'ADN de l'invention, dès 10 lors qu'elle n'affecte pas la fonctionnalité du gène d'intérêt. Cette séquence est également présente dans les constructions génétiques de l'invention (plasmides, cassettes), dans la partie comportant le gène d'intérêt (voir notamment le plasmide pXL2650). Préférentiellement, la séquence spécifique présente sur la molécule d'ADN de l'invention comprend entre 5 et 30 paires de bases.

15 Les oligonucléotides utilisés pour la mise en oeuvre du procédé selon l'invention peuvent contenir les bases suivantes :

- thymidine (T), qui est capable de former des triplets avec les doublets A.T de l'ADN double-brin (Rajagopal et al. Biochem 28 (1989) 7859);

20 - adénine (A), qui est capable de former des triplets avec les doublets A.T de l'ADN double-brin;

- guanine (G), qui est capable de former des triplets avec les doublets G.C de l'ADN double-brin;

- cytosine protonée (C+), qui est capable de former des triplets avec les doublets G.C de l'ADN double-brin (Rajagopal et al précitée);

25 Préférentiellement, l'oligonucléotide utilisé comprend une séquence homopyrimidique contenant des cytosines et la séquence spécifique présente sur la molécule d'ADN est une séquence homopurique-homopyrimidique. La présence de

cytosines permet d'avoir une triple hélice stable à pH acide, où les cytosines sont protonées, et déstabilisée à pH alcalin, où les cytosines sont neutralisées.

Pour permettre la formation d'une triple-hélice par hybridation, il est important que l'oligonucléotide et la séquence spécifique présente sur la molécule d'ADN de 5 l'invention soient complémentaires. A cet égard, pour obtenir les meilleurs rendements et la meilleure sélectivité, on utilise dans le procédé de l'invention un oligonucléotide et une séquence spécifique parfaitement complémentaires. Il peut s'agir en particulier d'un oligonucléotide poly-CTT et d'une séquence spécifique poly-GAA. A titre d'exemple, 10 on peut citer l'oligonucléotide de séquence GAGGCTTCTTCTTCTTCTTCTT (SEQ ID n° 5), dans lequel les bases GAGG ne forment pas de triple hélice mais permettent d'espacer l'oligonucléotide du bras de couplage.

Il est entendu toutefois que certains mésappariements peuvent être tolérés, dès lors qu'ils ne conduisent pas à une perte trop grande d'affinité. L'oligonucléotide utilisé peut être naturel (composé de bases naturelles, non modifiées) ou modifié 15 chimiquement. En particulier, l'oligonucléotide peut présenter avantageusement certaines modifications chimiques permettant d'augmenter sa résistance ou sa protection vis à vis des nucléases, ou son affinité vis à vis de la séquence spécifique.

Ainsi, l'oligonucléotide peut être rendu plus résistant aux nucléases par modification du squelette (ex. methylphosphonates, phosphorothiates, phosphotriester, 20 phosphoramidate, etc...). Un autre type de modification a plus particulièrement pour objet d'améliorer l'interaction et/ou l'affinité entre l'oligonucléotide et la séquence spécifique. En particulier, une modification tout à fait avantageuse selon l'invention consiste à méthylérer les cytosines de l'oligonucléotide. L'oligonucléotide ainsi méthylé présente la propriété remarquable de former une triple hélice stable avec la séquence 25 spécifique à pH neutre. Il permet donc de travailler à des pH plus élevés que les oligonucléotides de l'art antérieur, c'est-à-dire à des pH où les risques de dégradation de l'ADN plasmidique sont inférieurs.

La longueur de l'oligonucléotide utilisé dans le procédé de l'invention est d'au moins 3 bases, et de préférence, comprise entre 5 et 30. On utilise de manière

avantageuse un oligonucléotide de longueur supérieure à 10 bases. La longueur peut être adaptée au cas par cas par l'homme du métier en fonction de la sélectivité et de la stabilité de l'interaction recherchées.

Les oligonucléotides selon l'invention peuvent être synthétisés par toute 5 technique connue. En particulier, ils peuvent être préparés au moyen de synthétiseurs d'acides nucléiques. Toute autre méthode connue de l'homme du métier peut bien évidemment être utilisée.

Pour la mise en œuvre du procédé de l'invention, le ligand spécifique (protéine, acide nucléique, etc) peut être greffé ou non sur un support. Différents types de 10 supports peuvent être utilisés à cet effet, tels que notamment des supports de chromatographie fonctionnalisés, en vrac ou préconditionnés en colonne, des surfaces plastiques fonctionnalisées ou de billes de latex fonctionnalisées, magnétiques ou non. Il s'agit préférentiellement de supports de chromatographie. A titre d'exemple, les supports de chromatographie pouvant être utilisés sont l'agarose, l'acrylamide ou le 15 Dextran ainsi que leurs dérivés (tels que Séphadex, Sépharose, Superose,...), les polymères tels que le poly(styrènedivinylbenzène), ou la silice greffée ou non greffée, par exemple. Les colonnes de chromatographie peuvent fonctionner en mode de diffusion ou de perfusion.

Pour permettre son couplage covalent sur le support, le ligand est 20 généralement fonctionnalisé. S'agissant d'un oligonucléotide, il peut être modifié par exemple par un groupement terminal thiol, amine ou carboxyle, en position 5' ou 3'. En particulier, l'ajout d'un groupe thiol, amine ou carboxyle permet, par exemple, de coupler l'oligonucléotide sur un support portant des fonctions disulfure, maléimide, amine, carboxyle, ester, époxyde, bromure de cyanogène ou aldéhyde. Ces couplages 25 se forment par établissement de liaisons disulfure, thioether, ester, amide ou amine entre l'oligonucléotide et le support. Toute autre méthode connue de l'homme du métier peut être utilisée, telle que des réactifs de couplage bifonctionnels, par exemple.

Par ailleurs, pour améliorer l'activité de l'oligonucléotide couplé, il peut être avantageux d'effectuer le couplage au moyen d'un "bras". L'utilisation d'un bras permet

en effet de fixer l'oligonucléotide à une distance choisie du support permettant d'améliorer ses conditions d'interaction avec la molécule d'ADN de l'invention. Le bras est avantageusement constitué de bases nucléotidiques, n'interférant pas avec l'hybridation. Ainsi, le bras peut comprendre des bases puriques. A titre d'exemple, le
5 bras peut comprendre la séquence GAGG.

Les molécules d'ADN selon l'invention peuvent être utilisées dans toute application de vaccination ou de thérapie génique et cellulaire, pour le transfert d'un gène à un organisme, un tissu ou une cellule donnée. En particulier, elles peuvent être utilisées pour une administration directe in vivo, ou pour la modification de cellules in vitro ou ex vivo, en vue de leur implantation à un patient. A cet égard, les molécules selon l'invention peuvent être utilisées telles quelles (sous forme d'ADN nu), ou en association avec différents vecteurs chimiques et/ou biochimiques, synthétiques ou naturels. Il peut s'agir notamment de cations (phosphate de calcium, DEAE-dextran,...) qui agissent en formant des précipités avec l'ADN, lesquels peuvent être
10 "phagocytés" par les cellules. Il peut également s'agir de liposomes dans lesquels la molécule d'ADN est incorporée et qui fusionnent avec la membrane plasmique. Les vecteurs synthétiques de transfert de gènes sont généralement des lipides ou polymères cationiques qui complexent l'ADN et forment avec lui une particule portant des charges positives en surface. Ces particules sont capables d'interagir avec les charges
15 négatives de la membrane cellulaire, puis de franchir celle-ci. On peut citer comme exemples de tels vecteurs le DOGS (TransfectamTM) ou le DOTMA (LipofectinTM). Des protéines chimères ont aussi été développées : elles sont constituées d'une partie polycationique qui condense l'ADN, liée à un ligand qui se fixe sur un récepteur membranaire et entraîne le complexe dans les cellules par endocytose. Les molécules
20 d'ADN selon l'invention peuvent également être utilisées pour le transfert de gènes dans des cellules par des techniques physiques de transfection telles que le bombardement, l'électroporation, etc. En outre, préalablement à leur utilisation thérapeutique, les molécules de l'invention peuvent éventuellement être linéarisées par
25 exemple par coupure enzymatique.

A cet égard, un autre objet de la présente invention concerne toute composition pharmaceutique comprenant une molécule d'ADN au moins telle que définie ci-dessus. Cette molécule peut être nue ou associée à un vecteur chimique et/ou biochimique de transfection. Les compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent être formulées en vue d'administrations par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc. De préférence, la molécule d'ADN est utilisée sous une forme injectable ou en application. Elle peut être mélangée à tout véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe au niveau du site à traiter. Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. Il peut s'agir notamment de tampons Tris ou PBS dilués dans du glucose ou du chlorure de sodium. Une injection directe de l'acide nucléique dans la région atteinte du patient est intéressante car elle permet de concentrer l'effet thérapeutique au niveau des tissus affectés. Les doses d'acide nucléique utilisées peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du gène, du vecteur, du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée ou encore de la durée du traitement recherché.

Les molécules d'ADN de l'invention peuvent comporter un ou plusieurs gènes d'intérêt, c'est-à-dire un ou plusieurs acides nucléiques (ADNc, ADNg, ADN synthétique ou semi-synthétique, etc) dont la transcription et éventuellement la traduction dans la cellule cible génèrent des produits ayant un intérêt thérapeutique, vaccinal, agronomique ou vétérinaire.

Parmi les gènes d'intérêt thérapeutique, on peut citer plus particulièrement les gènes codant pour des enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les lymphokines : interleukines, interférons, TNF, etc (FR 9203120), les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les facteurs trophiques : BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, etc; les apolipoprotéines : ApoAI, ApoAIV, ApoE, etc (FR 93 05125), la dystrophine ou une

minidystrophine (FR 9111947), les gènes suppresseurs de tumeurs : p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc (FR 93 04745), les gènes codant pour des facteurs impliqués dans la coagulation : Facteurs VII, VIII, IX, etc, les gènes suicides : Thymidine kinase, cytosine désaminase, etc; ou encore tout ou partie d'une immunoglobuline naturelle ou artificielle (Fab, ScFv, etc), un ARN ligand (WO91/19813) etc. Le gène thérapeutique peut également être un gène ou une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent par exemple être transcrrites, dans la cellule cible, en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique décrite dans le brevet EP 140 308.

Le gène d'intérêt peut aussi être un gène vaccinant, c'est-à-dire un gène codant pour un peptide antigénique, capable de générer chez l'homme ou l'animal une réponse immunitaire, en vue de la réalisation de vaccins. Il peut s'agir notamment de peptides antigéniques spécifiques du virus d'epstein barr, du virus HIV, du virus de l'hépatite B (EP 185 573), du virus de la pseudo-rage, ou encore spécifiques de tumeurs (EP 259 212).

Généralement, dans les plasmides et molécules de l'invention, le gène d'intérêt thérapeutique, vaccinal, agronomique ou vétérinaire contient également une région promotrice de la transcription fonctionnelle dans la cellule ou l'organisme cible (i.e. les mammifères), ainsi qu'une région située en 3', et qui spécifie un signal de fin transcriptionnelle et un site de polyadénylation (cassette d'expression). Concernant la région promotrice, il peut s'agir d'une région promotrice naturellement responsable de l'expression du gène considéré lorsque celle-ci est susceptible de fonctionner dans la cellule ou l'organisme concernés. Il peut également s'agir de régions d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule cible. Parmi les promoteurs eucaryotes, on peut utiliser tout promoteur ou séquence dérivée stimulant ou réprimant la transcription d'un gène de façon spécifique ou non, inductible ou non, forte ou faible. Il peut s'agir en particulier de promoteurs ubiquitaires (promoteur des

gènes HPRT, PGK, α -actine, tubuline, etc), de promoteurs des filaments intermédiaires (promoteur des gènes GFAP, desmine, vimentine, neurofilaments, kératine, etc), de promoteurs de gènes thérapeutiques (par exemple le promoteur des gènes MDR, CFTR, Facteur VIII, ApoAI, etc), de promoteurs spécifiques de tissus (promoteur du gène pyruvate kinase, villine, protéine intestinale de liaison des acides gras, α -actine du muscle lisse, etc) ou encore de promoteurs répondant à un stimulus (récepteur des hormones stéroïdes, récepteur de l'acide rétinoïque, etc). De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus, tel que par exemple les promoteurs des gènes E1A et MLP d'adénovirus, le promoteur précoce du CMV, ou encore le promoteur du LTR du RSV, etc. En outre, ces régions promotrices peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique ou majoritaire.

Par ailleurs, le gène d'intérêt peut également comporter une séquence signal dirigeant le produit synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle du produit synthétisé, mais il peut également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence signal artificielle.

Selon le gène d'intérêt, les molécules d'ADN de l'invention peuvent être utilisées pour le traitement ou la prévention de nombreuses pathologies, incluant les maladies génétiques (dystrophie, fibrose cystique, etc), les maladies neurodégénératives (alzheimer, parkinson, ALS, etc), les cancers, les pathologies liées aux désordres de la coagulation ou aux dyslipoprotéinémies, les pathologies liées aux infections virales (hépatites, SIDA, etc), ou dans les domaines agronomique et vétérinaire, etc.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Légende des Figures

Figure 1 : Production d'un minicercle à partir d'une cassette intégrée dans le génome.

Figure 2 : Production d'un minicercle à partir d'un plasmide.

Figure 3 : Production d'un minicercle contenant une séquence spécifique d'un
5 ligand.

Figure 4 : Construction de pXL2649. Ori : Origine de réPLICATION; Kan^r : Gène marqueur conférant la résistance à la kanamycine; Amp^r : Gène marqueur conférant la résistance à l'ampicilline; galK : Gène de la galactosidase de E. Coli; Plac : Promoteur de l'opéron lactose.

10 Figure 5 : Activité luciférase obtenue après transfection de fibroblastes murins NIH3T3 par le plasmide pXL2650, le minicercle généré à partir du plasmide pXL2650 et le PGL2-Control (Promega Biotech). La transfection a été réalisée dans les conditions suivantes: 0,5 mg d'ADN par puits, 50000 cellules par puits. Le lipofectant utilisé est le RPR 115335. Le résultat est rapporté en RLU par microgramme de protéines en fonction du rapport de charge lipofectant/ ADN.
15

Figure 6: Construction du plasmide pXL2793. Ce plasmide génère après recombinaison un minicercle comportant une séquence synthétique homopurique-homopyrimidique et la cassette luciférase du pXL2727.

20 Figure 7 : Le puits 1 correspond à la digestion de la fraction éluée après purification par colonne triple hélice par SallI. Le puits 2 correspond à la digestion de la fraction éluée après purification par colonne triple hélice par XmnI. Le puits 3 correspond à la fraction éluée après purification par colonne triple hélice, non digérée. Le puits 4 correspond au plasmide pXL2793 non induit, non digéré. Les puits 5 et 6 correspondent respectivement au marqueur de taille d'ADN linéaire et d'ADN superenroulé.
25

Figure 8. Description schématique de la construction du plasmide pXL2776.

Figure 9. Description schématique des constructions des plasmides pXL2777 et pXL2960.

Figure 10. Action de l'intégrase du bactériophage 1 chez *E. coli* sur les plasmides pXL2777 et pXL2960. M : marqueur de poids moléculaire 1 kb d'ADN linéaire, ou d'ADN surenroulé. N.I. : non induit. I : induit. N.D. : non digéré.

Figure 11. Cinétique de recombinaison de l'intégrase du bactériophage 1 chez *E. coli* sur les plasmides pXL2777 et pXL2960. 2': 2 minutes. O/N: 14 heures. M : marqueur de poids moléculaire 1 kb d'ADN linéaire, ou d'ADN surenroulé. N.I. : non induit. I : induit. N.D. : non digéré.

10 Techniques générales de clonage et de biologie moléculaire

Les méthodes classiques de biologie moléculaire telles que la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césum-bromure d'éthidium, les digestions par des enzymes de restriction, l'électrophorèse sur gel, l'électroélution des fragments d'ADN à partir de gels d'agarose, la transformation dans *E. coli*, la précipitation des acides nucléiques etc, sont décrites dans la littérature (Maniatis *et al.*, 1989, Ausubel *et al.*, 1987). Les séquences nucléotidiques ont été déterminées par la méthode de terminaison de chaînes en suivant le protocole déjà présenté (Ausubel *et al.*, 1987).

20 Les enzymes de restriction ont été fournies par New-England Biolabs (Biolabs), Bethesda Research Laboratories (BRL) ou Amersham Ltd (Amersham).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN sont séparés selon leur taille sur des gels d'agarose à 0,7 % ou d'acrylamide à 8 %, purifiés par électrophorèse puis électroélution, extraits au phénol, précipités à l'éthanol puis incubés dans un tampon Tris-HCl pH 7.4 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 2 mM, en présence 25 d'ADN ligase du phage T4 (Biolabs). Les oligonucléotides sont synthétisés en utilisant la chimie des phosphoramidites protégés en b par un groupement cyanoéthyl (Sinha *et al.*, 1984, Giles 1985) avec le synthétiseur automatique d'ADN Biosearch 8600 en utilisant les recommandations du fabricant.

Les ADN ligaturés sont utilisés pour transformer la souche rendue compétente: *E. coli* MC1060 [(*lacIOPZYA*)X74, galU, galK, strA^r, hsdR] (Casadaban et al., 1983) ; HB101 [hsdS20, supE44, recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20, xyl-5, mtl-1, λ^- , F-] (Maniatis et al., 1989) et DH5 α [endA1 hsdR17, supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 λ^- $\Phi 80$ d_{lacZ} Δ M15] pour les plasmides.

Les milieux de culture LB et 2XTY sont utilisés pour la partie bactériologique (Maniatis et al., 1989).

Les ADN plasmidiques sont purifiés suivant la technique de lyse alcaline (Maniatis et al., 1989).

10 Définition des termes employés et abréviations.

ADN recombinant : ensemble de techniques qui permettent soit d'associer au sein du même microorganisme des séquences d'ADN qui ne le sont pas naturellement, soit de mutagéniser spécifiquement un fragment d'ADN.

ATP : adénosine 5'-triphosphate

15 BSA : sérum albumine bovine

PBS : tampon phosphate 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4

dNTP : 2'-désoxyribonucléosides 5'-triphosphates

DTT : dithiothréitol

kb : kilobases

20 pb : paires de bases

Exemple 1 : Construction d'un plasmide portant les séquences attP et attB, du bactériophage , en orientations directes répétées .

Le plasmide pNH16a a servi de matériel de départ dans la mesure où il contient déjà un fragment de bactériophage λ portant la séquence attP (Hasan et Szybalski, 1987). Ce plasmide a été digéré par EcoRI. Des oligonucléotides qui contiennent la séquence attB (Landy, 1989) ont été synthétisés. Ils ont la séquence suivante

Oligonucléotide 5476 (SEQ ID n°1)

5'-AATTGTGAAGCCTGCTTTTATACTAACTTGAGCGG-3'

Oligonucléotide 5477 (SEQ ID n°2)

5'-AATTCCGCTCAAGTTAGTATAAAAAAGCAGGCTTCAC-3'

Ils ont été hybridés pour reconstituer la séquence attB puis ligaturés au site
5 EcoRI du fragment EcoRI de 4.2 kb du pNH16a (Hasan et Szybalski, 1987). Après
transformation de DH5 α , un clone recombinant a été conservé. Le plasmide ainsi
construit a été nommé pXL2648 (voir Figure 4). Ce plasmide contient les séquences
attP et attB du bactériophage en orientation directe. Sous l'action de l'intégrase du
bactériophage (protéine Int) il doit y avoir excision des séquences comprises entre les
10 deux sites att. Ceci conduit à séparer ce qui est inséré entre les deux séquences att, de
l'origine de réPLICATION et du marqueur de résistance du plasmide, positionnés à
l'extérieur.

Exemple 2 : Obtention in-vivo chez E. coli d'un minicercle.

Une cassette de résistance à la kanamycine a été clonée au site EcoRI du
15 plasmide pXL2648 (Figure 4). Cette cassette provient du plasmide pUC4KIXX
(Pharmacia Biotech.). Pour ce faire, 10 g du plasmide pUC4KIXX ont été digérés par
EcoRI, puis séparés par électrophorèse sur gel d'agarose; le fragment de 1.6 kb
contenant le marqueur de résistance à la kanamycine a été purifié par électroélution; il
a ensuite été ligaturé au plasmide pXL2648 linéarisé par EcoRI. Les clones
20 recombinants ont été sélectionnés après transformation dans E. coli DH5 α et sélection
pour la résistance à la kanamycine. Le profil de restriction attendu a été observé sur un
clone; ce clone plasmidique a été nommé pXL2649 (Figure 4). Ce plasmide a été
introduit par transformation dans deux souches d'E. coli :

D1210 [hsdS20, supE44, recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2,
25 rpsL20, xyl-5, mtl-1, λ^- , F-, lacIq] (Sadler et al., 1980)

D1210HP, qui correspond à DH1210 lysogénisée par le phage xis- (Xis $^-$ Kil $^-$)
cI857 (Podjaska et al., 1985).

Les transformants ont été sélectionnés à 30°C sur milieu 2XTY avec de la kanamycine (50 mg/l). Après réisolement sur milieu sélectif, les souches ont été inoculées dans 5 ml de milieu L supplémenté avec de la kanamycine (50 mg/l). Après 16 hr d'incubation à 30°C avec agitation (5 cm d'amplitude rotative) les cultures ont 5 été diluées au 1/100ème dans 100 ml du même milieu. Ces cultures ont été incubées dans les mêmes conditions jusqu'à atteindre une DO₆₁₀ de 0.3. A ce moment, la moitié de la culture a été prélevée puis incubée 10 mn à 42°C pour induire le cycle lytique du phage , donc l'expression de l'intégrase. Après cette incubation les cultures ont été à nouveau transférées à 30°C puis incubées 1 hr dans ces conditions. Ensuite, les 10 cultures ont été arrêtées et des minipréparations d'ADN plasmidiques ont été réalisées. Quelles que soient les conditions, dans la souche D1210, le profil d'électrophorèse en gel d'agarose de l'ADN plasmidique non digéré du plasmide pXL2649 est inchangé ainsi que dans la souche D1210HP n'ayant pas été induite thermiquement. Au contraire dans D1210HP ayant été incubée 10 mn à 42 °C puis cultivée 1 heure à 30°C, on 15 constate qu'il n'y a non plus un plasmide, mais deux molécules circulaires d'ADN : une de bas poids moléculaire, migrant le plus rapidement et contenant un site EcoRI; et une de plus haut poids moléculaire, contenant un site unique BglI, comme attendu. Il y a donc bien eu excision des séquences présentes entre les deux séquences att, et génération d'un minicercle dénué de toute origine de réPLICATION. Cet ADN, circulaire, 20 superenroulé, ne portant pas d'origine de réPLICATION est désigné minicercle. Cette appellation rend en effet mieux compte du caractère circulaire de la molécule. Le plasmide pXL2649 de départ est présent, mais il représente environ 10 % du plasmide ayant excisé les séquences bordées par att.

Le minicercle peut ensuite être purifié par les techniques classiques de 25 purification d'ADN plasmidique puisqu'il est superenroulé comme de l'ADN plasmidique. Ces techniques comprennent, entre autre, la purification sur gradient de densité en chlorure de césum, en présence de bromure d'éthidium, ou bien l'utilisation de colonnes d'échange d'anions (Maniatis *et al.*, 1989). En outre si l'on estime que l'ADN plasmidique correspondant à l'origine de réPLICATION et au marqueur de sélection 30 est présent en quantité trop importante, il est toujours possible après purification d'utiliser une ou plusieurs enzymes de restriction qui digéreront le plasmide et pas le

minicercle, ce qui permet de les séparer par des techniques séparant l'ADN superenroulé de l'ADN linéaire, telles qu'en gradient de densité en chlorure de césum, en présence de bromure d'éthidium (Maniatis *et al.*, 1989).

5 **Exemple 3 : Obtention d'un minicercle contenant une cassette d'expression de la luciférase.**

Afin de tester l'utilisation *in vivo* de ces minicercles, un gène reporter avec les séquences nécessaires à son expression a été cloné dans le plasmide pXL2649 (cf exemple 2). Il s'agit plus particulièrement d'une cassette BglII-BamHI de 3150 pb issue de pGL2-Control (Promega Biotech.). Cette cassette contient le promoteur précoce de SV40, l'enhanceur du promoteur précoce de SV40, le gène de la luciférase de Photinus pyralis et un site de polyadénylation dérivé de SV40. Le fragment BglII-BamHI de 3150 bp a été cloné au site BamHI de pXL2649 digéré par BamHI de manière à remplacer la cassette de résistance à la kanamycine par la cassette d'expression de la luciférase de pGL2-control. Le plasmide ainsi construit a été appelé 10 pXL2650. Dans ce plasmide les sites attP et attB bordent la cassette d'expression de la luciférase. La recombinaison site spécifique permet d'exciser uniquement les séquences nécessaires à l'expression de la luciférase ainsi que le gène de la luciférase. Celle-ci 15 peut être réalisée exactement comme décrit à l'exemple 2. Un minicercle tel que le plasmide pXL2650 peut être ensuite utilisé dans des expériences de transfection *in vivo* 20 ou *in vitro*.

Une culture de 1 litre de la souche D1210HP pXL2650, en milieu 2XTY supplémenté avec de l'ampicilline (50 mg/ml) a été réalisée à 30°C. A une DO610 égale à 0.3, la culture a été transférée à 42°C pendant 20 mn, puis remise 20 mn à 30°C. L'ADN épisomal a été préparé par la technique du lysat clair (Maniatis *et al.*, 1989) 25 suivie d'un gradient de densité en chlorure de césum supplémenté avec du bromure d'éthidium (Maniatis *et al.*, 1989), puis d'une extraction du bromure d'éthidium à l'isopropanol et d'une dialyse. Cet ADN a montré contenir le minicercle. 100 g de cette préparation ont été digérés par PstI, puis l'hydrolysat a été soumis à un gradient de densité en chlorure de césum supplémenté avec du bromure d'éthidium (Maniatis *et*

al., 1989). Un résultat identique est obtenu lorsque la préparation est digérée conjointement par AlwNI et XmnI. La forme superenroulée a été récupérée et après élimination du bromure d'éthidium (Maniatis *et al.*), elle s'est avérée ne correspondre qu'au minicercle, dépourvu d'origine de réPLICATION et de tout gène marqueur. Cette 5 préparation de minicercle peut être utilisée pour des expériences de transfection *in vitro* et *in vivo*.

Exemple 4 : Transfection *in vitro* de cellules de mammifères et plus particulièrement de cellules humaines par un minicercle.

L'ADN minicercle contenant le gène de la luciférase de *Photinus pyralis* tel que 10 décrit à l'exemple 3, c'est à dire correspondant au minicercle généré à partir du plasmide pXL2650, est dilué dans du NaCl 150 mM et mélangé avec un transfectant. On peut utiliser divers transfectants commerciaux tels que le dioctadécylamido-glycylspermine (DOGS, TransfectamTM, Promega), la LipofectinTM (Gibco-BRL), etc, dans différents rapports de charges positives/négatives. A titre illustratif, l'agent 15 transfectant a été utilisé dans des rapports de charges supérieurs ou égaux à 3. Le mélange est vortexé, laissé 10 minutes à température ambiante, dilué dans du milieu de culture dépourvu de sérum de veau foetal, puis ajouté aux cellules, à raison de 2 µg d'ADN par puits de culture. Les cellules utilisées sont des Caco-2, dérivées d'un adénocarcinome du côlon humain, cultivées selon un protocole décrit (Wils *et al.*, 20 1994) et ensemencées la veille de l'expérience dans des plaques de culture à 48 puits, à raison de 50.000 cellules/puits. Après deux heures à 37°C, on ajoute 10% v/v de sérum de veau foetal et les cellules sont incubées 24 heures à 37°C en présence de 5% de CO₂. Les cellules sont lavées deux fois au PBS et l'activité luciférase est mesurée selon 25 le protocole décrit (tel que le kit Proméga). On peut utiliser d'autres lignées (fibroblastes, lymphocytes,...) provenant de différentes espèces, ou bien des cellules prélevées chez un individu (fibroblastes, kératinocytes, lymphocytes,...) et qui lui seront reinjectées après transfection.

Exemple 5 : Transfection *in vitro* de cellules NIH 3T3

L'ADN minicercle contenant le gène de la luciférase de Photinus pyralis, tel que décrit à l'exemple 3, c'est à dire correspondant au minicercle généré à partir du plasmide pXL2650 a été transfété in vitro dans des cellules de mammifères; le pXL2650 et le PGL2-Control (Promega Biotech.) qui comportent la même cassette d'expression ont été utilisés comme contrôle. Les cellules utilisées sont des fibroblastes murins NIH 3T3, ensemencées la veille de l'expérience dans des plaques de culture à 24 trous, à raison de 50.000 cellules par trou. Le plasmide est dilué dans du NaCl 150 mM et mélangé avec le lipofectant RPR115335. Cependant on peut utiliser divers autres agents commerciaux tels que le dioctadécylamidoglycyl spermine (DOGS, 5 TransfectamTM, Promega) (Demeneix et al. Int. J. Dev. Biol. 35 (1991) 481), la LipofectinTM (Gibco-BRL) (Fegner et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) 7413), etc. On utilise un rapport de charges positives du lipofectant/charges négatives de l'ADN égal ou supérieur à 3. Le mélange est vortexé, laissé dix minutes à température ambiante, dilué dans du milieu dépourvu de sérum de veau foetal, puis 10 ajouté aux cellules, à raison de 0,5 mg d'ADN par trou de culture. Après deux heures à 37°C, on ajoute 10 % volume à volume de sérum de veau foetal et les cellules sont incubées 48 heures à 37°C en présence de 5 % de CO₂. Les cellules sont lavées deux fois avec du PBS et l'activité luciférase est mesurée selon le protocole décrit (kit Promega, Promega Corp. Madison, WI), sur un luminomètre Lumat LB9501 (EG et G Berthold, Evry). Les résultats de transfection correspondant aux conditions qui 15 viennent d'être énoncées sont présentés figure 5. Ils montrent sans ambiguïté que le minicercle présente les mêmes propriétés de transfection que des plasmides possédant une origine de réPLICATION. Ainsi ces minicercles pourraient être utiliser indifféremment 20 de plasmides standards dans des applications de thérapie génique.

Exemple 6 : Purification d'un minicercle par affinité en utilisant une interaction hélice-triple.

Cet exemple décrit une méthode de purification d'un minicercle selon l'invention à partir d'un mélange comportant la forme plasmidique l'ayant excisé, par des interactions de type triple hélice qui vont se faire avec une séquence d'ADN 30 synthétique portée par le minicercle à purifier. Cet exemple démontre comment la

technologie de purification par formation d'une triple hélice peut être utilisée pour séparer un minicercle d'une forme plasmidique l'ayant excisé.

6-1. Obtention d'un minicercle comportant une séquence synthétique homopurique-homopyrimidique.

5 6-1.1. Insertion d'une séquence homopurique-homopyrimidique dans le plasmide pXL2650

Le plasmide pXL2650 possède un site unique BamHI juste après la cassette contenant le gène de la luciférase de Photinus pyralis. Ce site unique a été utilisé pour cloner les deux oligonucléotides suivants :

10 4957 (SEQ ID n°3)

5'-GATCCGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGA
AGAAGAAGAAGAAC-3'

4958 (SEQ ID n°4)

5'-GATCGTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTC
15 TTCTTCTTCG-3'

Ces oligonucléotides, une fois hybridés et clonés sur le plasmide pXL2650 apportent une séquence homopurique-homopyrimidique (GAA)₁₇, comme décrit ci-dessus.

Pour réaliser ce clonage les oligonucléotides ont tout d'abord été hybridés de 20 la manière suivante. Un g de chacun de ces deux oligonucléotides ont été mis ensemble dans 40 ml d'un tampon final 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM MgCl₂. Ce mélange a été chauffé à 95°C, puis il a été placé à la température ambiante de manière que la température s'abaisse lentement. Dix ng du mélange d'oligonucléotides hybridés ont été ligaturé avec 200 ng du plasmide pXL2650 linéarisé par BamHI, 30 ml final. Après 25 ligature une aliquote a été transformée dans DH5. Les mélanges de transformation ont été étalés sur milieu L supplémenté avec de l'ampicilline (50 mg/l). Vingt quatre clones ont été digérés par PflMI et BamHI. Un clone a été trouvé qui avait la taille du

fragment PflMI-BamHI de 950 pb augmenté de 50 pb. Ce clone a été retenu et nommé pXL2651.

Le plasmide pXL2651 a été purifié selon le kit Wizard Megaprep (Promega Corp., Madison, WI) en suivant les recommandations du fournisseur.

5 6-1.2. Insertion d'une séquence homopurique-homopyrimidique dans le plasmide pXL2649

a) Insertion de nouveaux sites de restriction de part et d'autre de la cassette kanamycine du pXL2649.

Le plasmide pXL2649, tel qu'il a été décrit exemple 2, a été digéré par EcoRI 10 de manière à ressortir la cassette kanamycine provenant du plasmide pUC4KIXX (PharmaciaBiotech, Uppsala, Suède). Pour ce faire 5 mg du plasmide pXL2649 ont été digérés par EcoRI. Le fragment de 4,2 kb a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose et purifié par électroélution.

D'autre part le plasmide pXL1571 a été utilisé. Celui-ci a été construit à partir 15 du plasmide pFR10 (Gene 25 (1983), 71-88), dans lequel le fragment de 1,6 kb provenant du pUC4KIXX, correspondant au gène de la kanamycine, a été inséré en SstI. Ce clonage a permis d'insérer de part et d'autre du gène de la kanamycine 12 nouveaux sites de restriction.

Cinq micro grammes de pXL1571 ont été dialysés par EcoRI. Le fragment de 20 1,6 kb correspondant au gène de la kanamycine a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose et purifié par électroélution. Il a été ensuite ligaturé avec le fragment EcoRI de 4,2 kb du pXL2649. Les clones recombinants ont été sélectionnés après transformation dans E.coli DH5a et sélection pour la résistance à la kanamycine et à l'ampicilline. Le profil de restriction attendu a été observé sur un clone; ce clone 25 plasmidique a été nommé pXL2791.

b) Extraction de la cassette kanamycine du plasmide pXL2791

Le plasmide pXL2791 a été digéré par SstI de manière à ressortir la cassette kanamycine. Le fragment de 4,2 kb a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose et purifié par le kit de gel extraction Jetsorb (Genomed). Il a ensuite été ligaturé. Les clones recombinants ont été sélectionnés pour la résistance à l'ampicilline après transformation dans E. coli DH5a. Le profil de restriction attendu a été observé sur un clone. Ce clone plasmidique a été nommé pXL2792. Ce clone comprend, entre autre, des sites de restriction SalI et XmaI entre les sites attP et attB.

c) Clonage d'une séquence homopurique-homopyrimidique ainsi que d'une cassette permettant l'expression de la luciférase entre les deux sites attP et attB du plasmide pXL2792

Le plasmide pXL2727 a été utilisé. Ce plasmide, digéré par XmaI et SalI, permet de ressortir un fragment comprenant : le promoteur pCMV, le gène de la luciférase de photinus pyralis, un site de polyadénylation dérivé de SV40 et une séquence homopurique-homopyrimidique. Cette dernière a été obtenue après hybridation et clonage des deux oligonucléotides suivants :

6006 : (SEQ ID N.16)

5' -GATCTGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGA
AGAAGAACTGCAGATCT-3'

6008 : (SEQ ID N.17)

20 5' -GATCAGATCTGCAGTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
CTTCTTCTTCTTCTTCA-3'

La séquence homopurique-homopyrimidique présente sur le pXL2727 a été séquencée par la méthode Sequenase Version 2.0 (United States Biochemical Corporation). Le résultat obtenu montre que la séquence homopurique-homopyrimidique réellement présente sur le plasmide pXL2727 comporte 10 répétitions (GAA-CTT) et non 17 comme le laissait prévoir la séquence des oligonucléotides 6006 et 6008. La séquence réellement présente sur le plasmide

pXL2727, lue après séquençage sur le brin correspondant   l'oligonucléotide 6008, est la suivante :

Un micro gramme de pXL2727 a été digéré par XmaI et SalI. Le fragment de 3,7 kb a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose et purifié par le kit de gel extraction Jetsorb (Genomed). D'autre part 1,7 mg de pXL2792 a été digéré par XmaI et SalI. Le fragment de 4,2 kb a été séparé sur gel d'agarose, purifié par le kit de gel extraction Jetsorb (genomed), et ligaturé avec le fragment XmaI-SalI de 3,7 kb du pXL2727. Les clones recombinants ont été sélectionnés après transformation dans E. coli DH5a et sélection pour la résistance à l'ampicilline. Le profil de restriction attendu a été observé sur un clone; ce clone a été nommé pXL2793. Le plasmide pXL2793 a été purifié en utilisant un gradient de densité en chlorure de césium selon une méthode déjà décrite (Maniatis et al., 1989).

6-2. Préparation de la colonne permettant de faire des interactions de type triple hélice avec une séquence homopurine-homopyrimidine présente sur le minicercle.

La colonne a été préparée de la manière suivante :

20 La colonne utilisée est une colonne HiTrap activée au NHS
(N-hydroxysuccinimide, Pharmacia) de 1 ml, connectée sur une pompe péristaltique
(débit < 1 ml/min). L'oligonucléotide spécifique utilisé possède un groupement NH₂ en
5'.

Pour le plasmide pXL2651, sa séquence est la suivante :

25 5'-GAGGCTTCTTCTTCTTCTTCTT-3' (SEQ ID n°5)

Pour le plasmide pXL2793, sa séquence est la suivante (oligo 116418) :

5'-CTTCTTCTTCTTCTTCTT-3' (SEQ ID N.19)

Les tampons utilisés sont les suivants :

Tampon de couplage : NaHCO₃ 0,2 M, NaCl 0,5 M, pH 8,3

Tampon de lavage :

5 Tampon A : éthanolamine 0,5 M, NaCl 0,5 M, pH 8,3

Tampon B : acétate 0,1 M, NaCl 0,5 M pH 4

Tampon de fixation et d'élution :

Tampon F : NaCl 2 M, acétate 0,2 M pH 4,5

Tampon E : Tris 1 M, HCl pH 9, EDTA 0,5 mM

10 La colonne est préparée de la manière suivante :

La colonne est lavée par 6 ml de HCl 1 mM, puis l'oligonucléotide dilué dans le tampon de couplage (50 nmoles dans 1 ml) est appliquée sur la colonne et laissé 30 minutes à température ambiante. La colonne est lavée par 3 ml de tampon de couplage, puis par 6 ml de tampon A, suivi de 6 ml de tampon B. Ces deux derniers tampons sont appliqués successivement trois fois sur la colonne. L'oligonucléotide est ainsi lié covallement à la colonne par une liaison CONH. La colonne est stockée à 4°C dans du PBS 0,1 % NaN₃.

6-3. Purification d'un minicercle comportant une séquence synthétique homopurique-homopyrimidique, par une interaction de type triple-hélice.

20 6-3.1. Purification du plasmide pXL2651

Le plasmide pXL2651 a été introduit dans la souche D1210HP. Cette souche recombinante [D1210HP (pXL2651)] a été cultivée comme cela est décrit à l'exemple 3, de manière à générer le minicercle contenant le gène de la luciférase de Photinus pyralis. Vingt ml de culture ont été prélevés et centrifugés. Le culot cellulaire est repris dans 1,5 ml de glucose 50 mM, Tris 25 mM HCl pH 8, EDTA 10 mM. La lyse est faite par 2 ml de NaOH 0,2 M, SDS 1 %, et la neutralisation par 1,5 ml d'acétate de

potassium 3 M, pH 5. L'ADN est ensuite précipité par 3 ml de propranol-2, le culot est repris dans 0,5 ml d'acétate de sodium 0,2 M pH 5, NaCl 0,1M et chargé sur une colonne d' oligonucléotides capable de former des interactions de type triple hélice avec des séquences poly GAA contenues dans le minicercle, comme décrit 5 précédemment. La colonne ayant été préalablement lavée avec 6 ml de tampon F, la solution contenant le minicercle à purifier après avoir été appliquée sur la colonne est incubée deux heures à température ambiante. La colonne est lavée par 10 ml de tampon F puis l'élution se fait par du tampon E.

On obtient ainsi de l'ADN purifié correspondant au minicercle. Le minicercle 10 obtenu, analysé par électrophorèse sur gel d'agarose et coloration au bromure d'éthidium, se présente sous la forme d'une seule bande d'ADN circulaire super enroulée. Il subsiste dans la préparation moins de 5 % de plasmide pXL2651 de départ.

6-3.2. Purification du plasmide pXL2793

15 Le plasmide pXL2793 de 7,9 kb a été introduit dans la souche D1210HP. Cette souche recombinante a été cultivée comme cela est décrit à l'exemple 3, de manière à générer le minicercle de 4 kb contenant le gène de la luciférase de *Photinus pyralis* et un plasmide de 3,9 kb. Deux cent ml de culture ont été prélevés et centrifugés. Le culot cellulaire a été traité par le Kit Wizard Megaprep (Promega Corp.,Madison,WI) 20 en suivant les recommandations du fournisseur. L'ADN a été repris dans un volume final de 2 ml de Tris 1mM, EDTA 1 mM, pH 8. Deux cent cinquante micro litres de cet échantillon plasmidique ont été dilués avec du tampon F dans un volume final de 2,5 ml. La colonne a été préalablement lavée avec 6 ml de tampon F. La totalité de l'échantillon dilué a été chargé sur une colonne d'oligonucléotide capable de former des 25 interactions de type triple hélice avec des séquences poly GAA contenues dans le minicercle, préparée comme décrit précédemment. Après lavage par 10 ml de tampon F, l'élution se fait par du tampon E. L'échantillon élué est récupéré par fraction de 1 ml.

Par cette méthode on obtient de l'ADN purifié correspondant au minicercle généré à partir de pXL2793. L'échantillon d'ADN élué de la colonne a été analysé par

électrophorèse sur gel d'agarose et coloration au bromure d'éthidium et par restriction enzymatique. Pour ce faire les fractions éluées se révélant contenir de l'ADN par dosage à D₂₆₀ nm ont été dialysées 24 heures contre du Tris 1mM, EDTA 1mM, puis précipitées à l'isopropanol et repris dans 200 ml d'H₂O. Quinze micro litres de 5 l'échantillon ainsi obtenu ont été digérés par SalI, ce site de restriction étant présent sur le minicercle et pas sur le plasmide de 3,9 kb généré par la recombinaison, ou par XmnI, ce site de restriction étant présent sur le plasmide de 3,9 kb généré par la recombinaison et pas sur le minicercle. Le résultat obtenu est présenté sur la figure 7, montrant que le minicercle a été purifié du plasmide recombinant.

10 **Exemple 7 : Transfection in vivo de cellules de mammifères par un minicercle.**

Cet exemple décrit le transfert d'un minicercle codant pour le gène de la luciférase dans le cerveau de souris nouveau-nées. Le minicercle (30 µg) est dilué dans du NaCl 150 mM stérile, à une concentration de 1 µg/µl. On rajoute ensuite un 15 transfectant synthétique, tel que le dioctadécylamidoglycylspermine (DOGS), dans un rapport de charges positives/négatives inférieur ou égal à 2. Le mélange est vortexé et 2 µg d'ADN sont injectés dans le cortex cérébral de souris nouveau-nées anesthésiées, à l'aide d'un micromanipulateur et d'une microseringue. Les cerveaux sont prélevés 48 heures plus tard, homogénéisés, centrifugés et le surnageant est utilisé pour le dosage 20 de la luciférase par les protocoles décrits (tels le kit Promega).

Exemple 8 : Utilisation du locus par de RK2 pour diminuer la présence de topo-isomères de minicercle ou de miniplasmide

Cet exemple met en évidence la présence de formes topologiques dérivées i) du plasmide possédant les séquences attP et attB en orientation directe, ii) du minicercle 25 ou iii) du miniplasmide, après action de l'intégrase du bactériophage λ chez E. coli. Cet exemple montre aussi que ces formes topologiques ou oligomériques peuvent être résolues par l'utilisation du locus par de RK2 (Gerlitz et coll. 1990 J. Bacteriol. 172p6194). En effet, ce locus contient en particulier le gène parA codant pour une

résolvase agissant au site mrs (système de résolution de multimères) (Eberl et coll. 1994 Mol. Microbiol. 12 p.131).

8-1.-Construction des plasmides pXL2777 et pXL2960

Les plasmides pXL2777 et pXL2960 sont dérivés du vecteur pXL2776 et possèdent en commun le réplicon minimal de ColE1, le gène du transposon Tn5 codant pour la résistance à la kanamycine et les séquences attP et attB du bactériophage 1 en orientation directe. Ces plasmides sont différents au niveau des gènes insérés entre les séquences attP et attB en particulier le pXL2777 contient la cassette omegon (codant pour le gène de résistance à la spectinomycine) alors que le plasmide pXL2960 porte le locus par de RK2.

8-1.1. Vecteur minimal pXL2658

Le vecteur pXL2658 (2,513 kb) possède le réplicon minimal de ColE1 issu de pBluescript (ori) et le gène du transposon Tn5 codant pour la résistance à la kanamycine (Km) pour marqueur de sélection. Après avoir rendu l'extrémité BsaI franche par action de la Klenow, le fragment BsaI-PvuII de 1,15 kb de pBKS+ (provenant de Stratagene) a été cloné avec le fragment SmaI de 1,2 kb du pUC4KIXX (provenant de Pharmacia) pour générer le plasmide pXL2647. Les oligonucléotides 5542 5'(AGC TTC TCG AGC TGC AGG ATA TCG AAT TCG GAT CCT CTA GAG CGG CCG CGA GCT CC)3' (SEQ ID N.20) et 5543 5'(AGC TGG AGC TCG CGG CCG CTC TAG AGG ATC CGA ATT CGA TAT CCT GCA GCT CGA GA)3' (SEQ ID N.21) ont été hybridés entre eux puis clonés au site HindIII du pXL2647 ainsi est construit le pXL2658. Sur ce plasmide, le multisite est SstI, NotI, XbaI, BamHI, EcoRI, EcoRV, PstI, XhoI, et HindIII entre l'origine de réPLICATION et le gène codant pour la résistance à la kanamycine.

25 8-1.2. Vecteur pXL2776 contenant les séquences attP et attB du phage 1

Le vecteur pXL2776 (2,93 kb) possède le réplicon minimal de ColE1 issu de pBluescript, le gène codant pour la résistance à la kanamycine et les séquences attP et attB du bactériophage 1 en orientation directe, voir figure 8. La séquence attB de 29

pb (Mizuuchi et coll. 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 p3220) a été introduite entre les sites de restriction SacI et HindIII du pXL2658 après avoir hybridé l'oligonucléotide sens 6194 5'(ACT AGT GGC CAT GCA TCC GCT CAA GTT AGT ATA AAA AAG CAG GCT TCA G)3' (SEQ ID N.22) avec l'oligonucléotide 5 antisens 6195 5'(AGC TCT GAA GCC TGC TTT ATA CTA ACT TGA GCG GAT GCA TGG CCA CTA GTA GCT)3' (SEQ ID N.23) de telle sorte que les sites SacI et HindIII ne soient plus reconstitués après clonage. Ce plasmide, dont la séquence a été vérifiée en attB, est alors digéré par SpeI et NsiI pour y introduire la séquence attP encadrée par les sites de restriction NsiI et XbaI et générer alors le 10 plasmide pXL2776. La séquence attP a été obtenue par amplification PCR en utilisant le plasmide pXL2649 (décrit dans l'exemple 2) comme matrice, les oligonucléotides 6190 sens 5'(GCG TCT AGA ACA GTA TCG TGA TGA CAG AG)3' (SEQ ID N.24) et 6191 antisens 5'(GCC AAG CTT AGC TTT GCA CTG GAT TGC GA)3' (SEQ ID N.25) et en effectuant 30 cycles au cours desquels la température 15 d'hybridation est de 50°C . Le produit PCR digéré par les sites XbaI et HindIII a été cloné dans le phage M13mpEH entre les sites XbaI et HindIII. La séquence amplifiée est identique à la séquence de attP décrite dans Lambda II (édité par R.W. Hendrix, J.W. Roberts, F.W. Stahl, R.A. Weisberg; Cold Spring Harbor Laboratory 1983) entre les positions 27480 et 27863.

20 8-1.3. Plasmide pXL2777

Le plasmide pXL2777 (6,9 kb) possède le réplicon minimal de ColE1 issu de pBluescript, le gène codant pour la résistance à la kanamycine, les séquences attP et attB du bactériophage l en orientation directe et séparées par le gène sacB codant pour la levanesucrase de B. subtilis (P. Gay et coll. 1983 J. Bacteriol. 153 p1424) et 25 l'omegon Sp codant pour le gène de résistance à la spectinomycine Sp et la streptomycine Sm (P. Prentki et coll. 1984 Gene 29 p303). La cassette sacB-Sp ayant des extrémités de clonage EcoRV et NsiI provient du plasmide pXL2757 (FR95/01632) et a été clonée entre les sites EcoRV et NsiI du pXL2776 pour former le pXL2777.

8-1.4. Plasmide pXL2960

Le plasmide pXL2960 (7,3 kb) possède le réplicon minimal de ColE1 issu de pBluescript, le gène codant pour la résistance à la kanamycine, les séquences attP et attB du bactériophage 1 en orientation directe et séparées par i) le gène sacB codant pour la levanesucrase de B. subtilis (P. Gay et coll. 1983 J. Bacteriol. 153 p1424) et ii) le locus par de RK2 (Gerlitz et coll. 1990 J. Bacteriol. 172p6194). La cassette par ayant des extrémités BamHI provient du plasmide pXL2433 (PCT/FR95/01178) et a été introduite entre les sites BamHI du pXL2777 pour générer le pXL2960.

8-2. Resolution de topo-isomères de minicercle ou de miniplasmide

Les plasmides pXL2777 et pXL2960 ont été introduits par transformation dans la souche de E. coli D1210HP. Les transformants ont été sélectionnés et analysés comme cela a été décrit dans l'exemple 2 avec les modifications suivantes : l'expression de l'intégrase a été induite à 42°C pendant 15 min lorsque la densité optique à 610 nm des cellules est de 1,8 puis les cellules sont incubées à 30°C pendant 30 min, voir figure 9 ou pendant une durée variant de 2 minutes à 14 heures (O/N), voir figure 10. L'ADN plasmidique provenant des cultures non induite et induite a été analysé sur gel d'agarose avant ou après digestion par un enzyme de restriction unique à la partie minicercle (EcoRI) ou miniplasmide (BglII), voir figureY, ou après action de l'ADN topo-isomérase A ou la gyrase de E. coli. Les formes dimères surenroulées de minicercle ou miniplasmide sont clairement mises en évidence par i) leur poids moléculaire, ii) leur linéarisation par l'enzyme de restriction, iii) leur changement de topologie par l'action de la topo-isomérase A (dimère relâché) ou de la gyrase (dimère supersuperenroulé), iv) l'hybridation spécifique avec un fragment interne propre au minicercle ou au miniplasmide. D'autres formes topologiques de poids moléculaires plus élevées que celui du plasmide initial sont issues du plasmide initial ou du minicercle ou du miniplasmide puisqu'elles disparaissent après digestion par l'enzyme de restriction unique à la partie minicercle (EcoRI) ou miniplasmide (BglII). Ces formes sont beaucoup moins abondantes avec le pXL2960 qu'avec le pXL2777 comme plasmide initial, voir figure 10. En particulier la forme dimère de minicercle est présente de manière non négligeable avec le plasmide pXL2777 alors qu'elle est

invisible avec le plasmide pXL2960, lorsque les cellules sont incubées au moins 30 min à 30°C, voir figures 9 et 10. Il est à noter que des dimères de minicercle sont observés en début de cinétique avec le pXL2960 (2 à 10 min.), puis sont ensuite résolus (après 30 min.), voir figure 10. Par conséquent le locus par conduit à une diminution significative des formes oligomériques/topologiques résultant de l'action de l'intégrase du bactériophage 1 chez E. coli sur les plasmides contenant les séquences attP et attB en orientation directe.

IDENTIFICATION DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES

5' -GATCAGATCTGCAGTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCA-3'

SEQ ID n° 18 : (Séquence présente sur le plasmide pXL2727 correspondant à l'oligonucléotide 6008) :

5 5' -GATCAGATCTGCAGTCTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCA-3'

SEQ ID n° 19 : (oligonucléotide 116418) :

5' -CTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT-3'

SEQ ID n° 20 : (oligonucléotide 5542) :

10 5' -AGCTTCTCGAGCTGCAGGATATCGAATTGGATCCTCTAGAGCGGCCGCGAGCTCC-3'

SEQ ID n° 21 : (oligonucléotide 5543) :

5' -AGCTGGAGCTCGCGGCCGCTCTAGAGGATCCGAATTGATATCCTGCAGCTCGAGA-3'

15 SEQ ID n° 22 : oligonucléotide sens 6194 :

5' -ACTAGTGGCCATGCATCCGCTCAAGTTAGTATAAAAAAGCAGGCTTCAG-3'

SEQ ID n° 23 : oligonucléotide antisens 6195 :

5' -AGCTCTGAAGCCTGCTTTTATACTAACTTGAGCGGATGCATGGCCACTAGTA
GCT-3'

20 SEQ ID n° 24 : oligonucléotide sens 6190 :

5' -GCGTCTAGAACAGTATCGTGATGACAGAG-3'

SEQ ID n° 25 : oligonucléotide antisens 6191 :

5' -GCCAAGCTTAGCTTGCACTGGATTGCGA-3'

Références bibliographiques

Ausubel *et al.* Current protocols in molecular biology 1987-1988. John Wiley and Sons, New York.

5 Behr J.P. 1993. Acc. Chem. Res. 26:274-278.

Casadaban *et al.* 1983. Methods Enzymol. 100, 293-308.

Cotten *et al.* E. 1993. Curr. Biol. 4:705-710.

Giles, J. W. 1985. Am. Biotechnol., Nov./Dec.

Hasan *et al.* 1987. Gene 56:145-151.

10 Jain, R. K. 1987. Cancer Res. 47:3039-3051.

Landford *et al* 1986. Cell 46:575-582.

Landy, A. 1989. Ann. Rev. Biochem. 58:913-949.

Maniatis, T., E. F . Fritsch, and J. Sambrook. 1989. Molecular cloning : a laboratory manual, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor

15 Laboratory Press, New York.

Nabel *et al.* 1992. Human Gene Therapy 3:399-410.

Podhajska *et al.* 1985. Gene 40:163:168.

Sadler *et al.* 1980. Gene, 8:279-300.

Sinha *et al.* 1984. Acids Res., 12, 4539-4557.

20 Stark *et al.* 1992. Trends Genet. 8:432-439.

Viera *et al.* 1982. Gene, 19, 259-268.

Wils *et al.* Biochem. Pharmacol. 48:1528-1530.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

5

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: RHONE-POULENC RORER S.A.
- (B) RUE: 20, avenue Raymond ARON
- (C) VILLE: ANTONY
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 92165

10

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Molécules d'ADN, préparation et utilisation en thérapie génique.

15

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 25

20

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Tape
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

25

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

30

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 37 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

35

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

40

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

AATTGTGAAG

37

CCTGCTTTTT

TATACTAACT

TGAGCGG

45

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

50

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 37 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

55

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

60

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

AATTCCGCTC
37

AAGTTAGTAT

AAAAAAAGCAG

GCTTCAC

5

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

10 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 57 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

15 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

20 (iii) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

25 GATCCGAAGA AGAAGAAGAA GAAGAAGAAG AAGAAGAAGA AGAAGAAGAA GAAGAAC
57

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

30 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 57 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

35 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

40 (iii) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

45 GATCGTTCTT CTTCTTCTTC TTCTTCTTCT TCTTCTTCTT CTTCTTCTTC TTCTTCG
57

50 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

55 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 25 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

60 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

5 GAGGCTTCTT CTTCTTCTTC TTCTT

25

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

10 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 21 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
15 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

20 (iii) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

25 CTGCTTTTTT ATACTAACTT

G

21

30 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 21 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
35 (C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

40 (iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

45 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

CAGCTTTTTT ATACTAAAGTT

G

21

50 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

55 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 21 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

60

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

5

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

CAGCGCATTC
21

GTAATGCGAA

G

10

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:

15

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 21 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

20

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

25

(iii) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

30

CTTATAATTTC
21

GTAATGCGAA

G

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 10:

35

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 19 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

40

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

45

(iii) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

50

AACACTTTCT
19

TAAATGGTT

55

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 11:

60

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 19 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

5 (iii) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

10 AACACTTTCT 19 TAAATTGTC

15 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 19 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

20 (C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

25 (iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

30 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

AAGGGATTAA 19 AAATCCCTC

35 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 19 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

40 (C) NOMBRE DE BRINS: double

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

45 (iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

50 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

ATGGTATTAA 19 AAATCCCTC

55

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

60 (A) LONGUEUR: 49 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

5 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

10 (iii) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

15 TTCTCTGTGCG 49 GGGTGGCGGG ATTGAACCC ACGACCTCTT CGTCCCGAA

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 15:

20 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 27 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

25 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

30 (iii) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

35 CGTCGAAATA 27 TTATAAATTA TCAGACA

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 16:

40 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 66 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

45 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

50 (iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

55 GATCTGAAGA AGAAGAAGAA GAAGAAGAAG AAGAAGAAGA AGAAGAAGAA GAAGAACTGC
60 AGATCT
66

60

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 17:

5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 66 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

10 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

15

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

20 GATCAGATCT GCAGTTCTTC TTCTTCTTCT TCTTCTTCTT CTTCTTCTTC TTCTTCTTCT
60
TCTTCA
66

25 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 18:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 58 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

35 (iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

40 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

GATCAGATCT GCAGTCTCT TCTTCTTCTT CTTCTTCTTC TTCTTCTTCT CTTCTTCA
58

45

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 21 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

55 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

60

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

5 CTTCTTCTTC TTCTTCTTCT T
21

5

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 20:

10 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 56 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

15 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

20 (iii) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:

25 AGCTTCTCGA GCTGCAGGAT ATCGAATTAG GATCCTCTAG AGCGGCCGCG AGCTCC
56

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 21:

30 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 56 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

35 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

40 (iii) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 21:

45 AGCTGGAGCT CGCGGCCGCT CTAGAGGATC CGAATTAGAT ATCCTGCAGC TCGAGA
56

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 22:

50 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 49 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

60

(iii) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 22:

5 ACTAGTGGCC ATGCATCCGC TCAAGTTAGT ATAAAAAAAGC AGGCTTCAG
49

10 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 23:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 57 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
15 (C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

20 (iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

25 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 23:

AGCTCTGAAG CCTGCTTTTT TATACTAACT TGAGCGGATG CATGGCCACT AGTAGCT
57

30 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 24:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 29 paires de bases
35 (B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

40 (iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

45 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 24:

GCGTCTAGAA CAGTATCGTG ATGACAGAG
29

50

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 25:

55 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 29 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

60 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

5 (iii) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 25:

10 GCCAAGCTTA GCTTTGCACT GGATTGCGA
 29

REVENDICATIONS

1. Molécule d'ADN double brin caractérisée en ce que :
 - elle est sous forme circulaire et superenroulée,
 - elle comprend une cassette d'expression constituée d'un gène d'intérêt sous 5 contrôle d'un promoteur et d'un terminateur transcriptionnels actifs dans les cellules mammifères,
 - elle est dépourvue d'origine de réPLICATION
 - elle est dépourvue de gène marqueur, et,
 - elle comprend une région résultant de la recombinaison site-spécifique entre 10 deux séquences, ladite région étant située hors de la cassette d'expression.
2. Molécule selon la revendication 1 caractérisée en ce qu'elle contient en outre une séquence capable d'interagir spécifiquement avec un ligand.
3. Molécule selon la revendication 2 caractérisée en ce que la séquence capable d'interagir spécifiquement avec un ligand est une séquence capable de former une triple-hélice par hybridation avec un oligonucléotide spécifique. 15
4. Molécule selon la revendication 3 caractérisée en ce que la séquence capable de former une triple-hélice comprend de 5 à 30 paires de bases.
5. Molécule selon la revendication 3 ou 4 caractérisée en ce que la séquence capable de former une triple-hélice est une séquence homopurique-homopyrimidique.
- 20 6. Molécule selon la revendication 1 caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence résultant de la recombinaison site-spécifique entre deux séquences d'attachement att ou entre deux séquences de reconnaissance de la résolvase d'un transposon ou parA de RK2.
- 25 7. Molécule selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce qu'elle comprend en outre une séquence mrs issue du locus par de RK2, permettant de résoudre les multimères.
8. Molécule selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que le gène d'intérêt est un acide nucléique codant pour un produit thérapeutique, vaccinal, agronomique ou vétérinaire.

9. Molécule selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'elle est obtenue par excision à partir d'un plasmide ou d'un chromosome, par recombinaison site-spécifique.
10. ADN recombinant comprenant une cassette d'expression constituée d'un gène d'intérêt sous contrôle d'un promoteur et d'un terminateur transcriptionnels actifs dans les cellules mammifères encadrée par deux séquences permettant une recombinaison site-spécifique, positionnées en orientation directe.
 - 5
11. ADN recombinant selon la revendication 10 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un plasmide répliquatif comprenant :
 - 10
- a) une origine de réplication et éventuellement un gène marqueur,
- b) deux séquences permettant une recombinaison site-spécifique positionnées en orientation directe, et,
- c) placés entre lesdites séquences b), une cassette d'expression constituée d'un gène d'intérêt sous contrôle d'un promoteur et d'un terminateur transcriptionnels actifs dans
- 15
- les cellules mammifères.
12. ADN recombinant selon les revendications 10 et 11 caractérisé en ce que les séquences permettant la recombinaison site-spécifique sont des séquences capables de recombiner spécifiquement en présence d'une recombinase.
13. ADN recombinant selon la revendication 12 caractérisé en ce que la recombinase
 - 20
- est choisie parmi les recombinases de la famille de l'intégrase du phage lambda et de la famille de la résolvase du transposon Tn3.
14. ADN recombinant selon l'une des revendications 10 à 13 caractérisé en ce que les séquences permettant la recombinaison site-spécifique sont dérivées d'un bactériophage.
- 25
15. ADN recombinant selon la revendication 14 caractérisé en ce que les séquences permettant la recombinaison site-spécifique sont constituées par les séquences d'attachement att d'un bactériophage ou de séquences dérivées.
16. ADN recombinant selon la revendication 15 caractérisé en ce que les séquences permettant la recombinaison site-spécifique sont constituées par les séquences
 - 30
- d'attachement du bactériophage lambda, P22, Φ 80, P1, HP1 ou encore du plasmide pSAM2 ou 2 ou de séquences dérivées.

17. ADN recombinant selon la revendication 16 caractérisé en ce que les séquences permettant la recombinaison site-spécifique comprennent tout ou partie des séquences SEQ ID n° 1, 2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ou 14.

18. Plasmide caractérisé en ce qu'il comprend :

5 (a) une origine de réPLICATION bactérienne et éventuellement un gène marqueur
 (b) les séquences attP et attB d'un bactériophage sélectionné parmi les phages lambda, P22, Φ80, P1, HP1 ou du plasmide pSAM2 ou 2 positionnées en orientation directe; et
10 (c) placés entre lesdites séquences, une cassette d'expression constituée d'un gène d'intérêt sous contrôle d'un promoteur et d'un terminateur transcriptionnels actifs dans les cellules mammifères.

19. Plasmide selon la revendication 18 caractérisé en ce que les séquences permettant la recombinaison site-spécifique sont constituées par les séquences d'attachement du bactériophage lambda.

15 20. ADN recombinant selon la revendication 14 caractérisé en ce que les séquences permettant la recombinaison site-spécifique sont dérivées du bactériophage P1.

21. Plasmide caractérisé en ce qu'il comprend :

 (a) une origine de réPLICATION bactérienne et éventuellement un gène marqueur ;
 (b) les séquences répétées inversées du bactériophage P1 (région loxP) positionnées en orientation directe ; et,
20 (c) placés entre lesdites séquences (b), une cassette d'expression constituée d'un gène d'intérêt sous contrôle d'un promoteur et d'un terminateur transcriptionnels actifs dans les cellules mammifères.

22. ADN recombinant selon l'une des revendications 10 à 13 caractérisé en ce que les 25 séquences permettant la recombinaison site-spécifique sont dérivées d'un transposon.

23. ADN recombinant selon la revendication 22 caractérisé en ce que les séquences permettant la recombinaison site-spécifique sont constituées par des séquences de reconnaissance de la résolvase du transposon Tn₃, Tn₂₁ ou Tn₅₂₂ ou de séquences dérivées.

24. ADN recombinant selon la revendication 23 caractérisé en ce que les séquences permettant la recombinaison site-spécifique comprennent tout ou partie de la séquence SEQ ID n° 15.

25. ADN recombinant selon l'une des revendications 10 à 13 caractérisé en ce que les 5 séquences permettant la recombinaison site-spécifique sont dérivées de la région par du plasmide RP4.

26. ADN recombinant selon l'une des revendications 10 à 25 caractérisé en ce qu'il comprend en outre une séquence capable d'interagir spécifiquement avec un ligand.

27. Plasmide caractérisé en ce qu'il comprend :

10 a) une origine de réPLICATION et éventuellement un gène marqueur,

b) deux séquences permettant une recombinaison site-spécifique positionnées en orientation directe, et,

c) placés entre lesdites séquences b), un ou plusieurs gènes d'intérêt et une séquence capable d'interagir spécifiquement avec un ligand.

15 28. Plasmide caractérisé en ce qu'il comprend :

a) une origine de réPLICATION et éventuellement un gène marqueur,

b) deux séquences permettant une recombinaison site-spécifique positionnées en orientation directe, et,

c) placés entre lesdites séquences b), un ou plusieurs gènes d'intérêt et une séquence 20 mrs issue du locus par de RK2, permettant de résoudre les multimeres.

29. Plasmide caractérisé en ce qu'il comprend :

a) une origine de réPLICATION et éventuellement un gène marqueur,

b) deux séquences permettant une recombinaison site-spécifique positionnées en orientation directe, et,

25 c) placés entre lesdites séquences b), un ou plusieurs gènes d'intérêt, une séquence mrs issue du locus par de RK2, permettant de résoudre les multimeres et une séquence capable d'interagir spécifiquement avec un ligand.

30. Plasmide caractérisé en ce qu'il comprend :

a) une origine de réPLICATION et éventuellement un gène marqueur,

b) deux séquences permettant une recombinaison site-spécifique intégrase-dépendante 30 positionnées en orientation directe et deux séquences permettant une recombinaison

site-spécifique resolvase-dépendante positionnées à côté des deux premières et également en orientation directe, et,

c) placés entre lesdites séquences b), un ou plusieurs gènes d'intérêt et éventuellement une séquence capable d'interagir spécifiquement avec un ligand.

- 5 31. Plasmide selon les revendications 27, 29 et 30 caractérisé en ce que la séquence capable d'interagir spécifiquement avec un ligand est définie comme dans les revendications 2 à 5.
32. Cellule recombinante contenant un plasmide selon la revendication 14, 27, 29 ou 30.
- 10 33. Cellule recombinante comprenant, inséré dans son génome, une ou plusieurs copies d'un ADN recombinant selon la revendication 10.
34. Cellule recombinante selon la revendication 32 ou 33 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une bactérie.
- 15 35. Cellule recombinante selon la revendication 32 ou 33 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule eucaryote.
36. Cellule recombinante selon la revendication 34 caractérisée en ce qu'il s'agit de la bactérie E. coli D1210HP.
37. Composition pharmaceutique comprenant une molécule d'ADN au moins selon l'une des revendications 1 à 9.
- 20 38. Procédé de préparation d'une molécule d'ADN selon l'une des revendications 1 à 9 caractérisé en ce que une culture de cellules hôtes contenant un ADN recombinant tel que défini dans la revendication 10 est mise en contact avec la recombinase permettant d'induire la recombinaison site-spécifique in vivo.
- 25 39. Procédé selon la revendication 38 caractérisé en ce que la culture de cellules hôtes est une culture de cellules selon la revendication 32.
40. Procédé selon la revendication 38 caractérisé en ce que la culture de cellules hôtes est une culture de cellules selon la revendication 33.

41. Procédé selon l'une des revendications 38 à 40 caractérisé en ce que la mise en contact avec la recombinase est effectuée par transfection ou infection de la culture de cellules avec un plasmide ou un phage contenant le gène de la dite recombinase.
42. Procédé selon l'une des revendications 38 à 40 caractérisé en ce que la mise en contact avec la recombinase est effectuée par induction de l'expression d'un gène codant pour la dite recombinase, présent dans la cellule hôte.
5
43. Procédé selon la revendication 42 caractérisé en ce que la cellule hôte contient, intégrée dans son génome, le gène de la recombinase ayant une expression thermorégulée et la mise en contact avec la recombinase est effectuée par culture à la température d'induction.
10
44. Procédé selon la revendication 43 caractérisé en ce que la cellule hôte utilisée contient un phage lysogène intégré dans son génome, contenant le gène de ladite recombinase.
45. Procédé de préparation d'une molécule d'ADN selon l'une des revendications 1 à 9 caractérisé en ce que une préparation de plasmide selon la revendication 11 est mise en contact avec la recombinase permettant d'induire la recombinaison site-spécifique in vitro.
15
46. Procédé selon la revendication 37 ou 45 caractérisé en ce qu'il comprend une étape supplémentaire de purification du minicerce.
20
47. Procédé selon la revendication 46 caractérisé en ce que la purification comprend une étape de mise en contact d'une solution contenant le minicerce avec un ligand spécifique, éventuellement greffé sur un support.
48. Procédé selon la revendication 47 caractérisé en ce que la solution contenant le minicerce est mise en contact avec un oligonucléotide, éventuellement greffé sur un support, capable de former par hybridation une triple-hélice avec une séquence spécifique présente dans le minicerce.
25

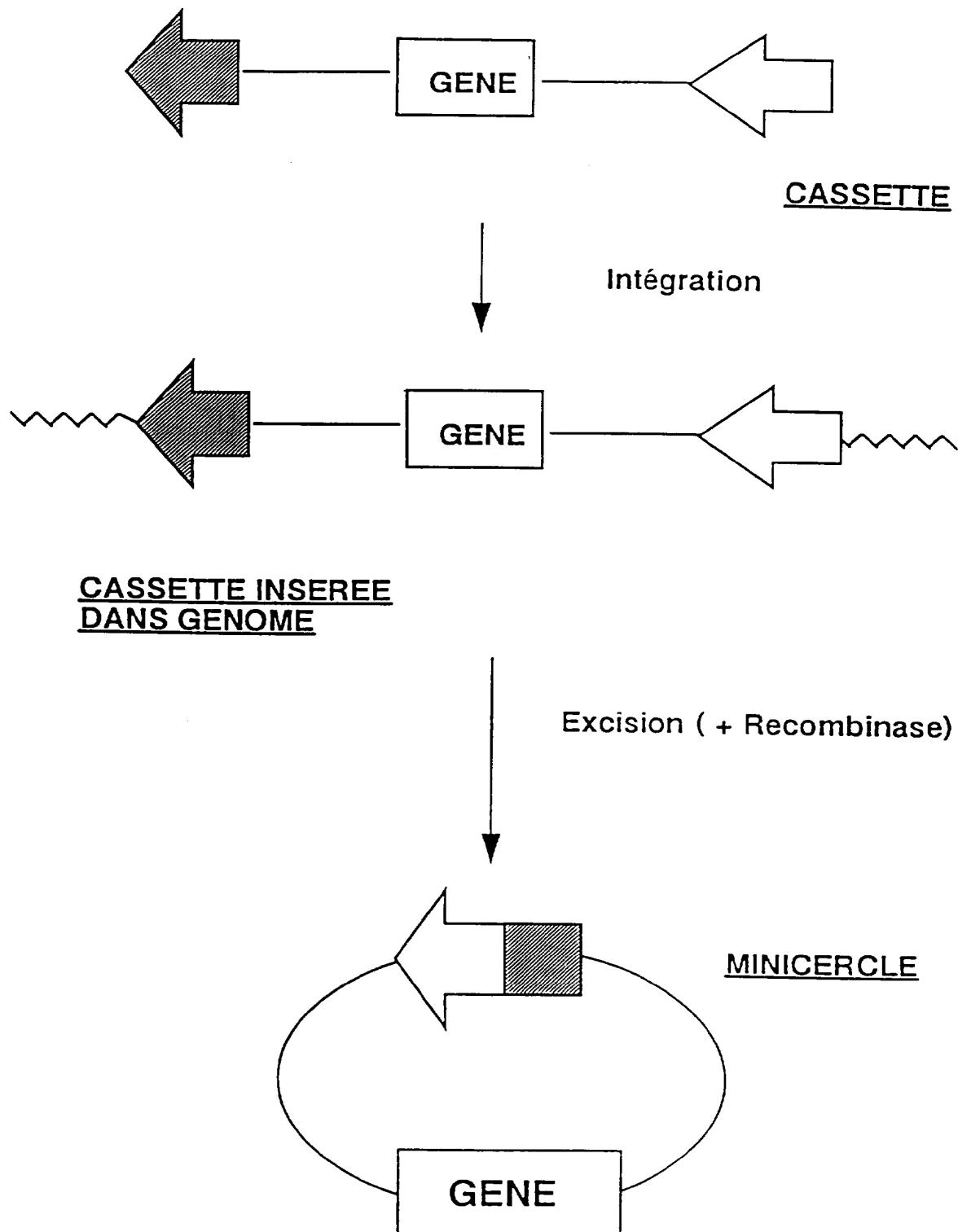


Figure 1

2/11

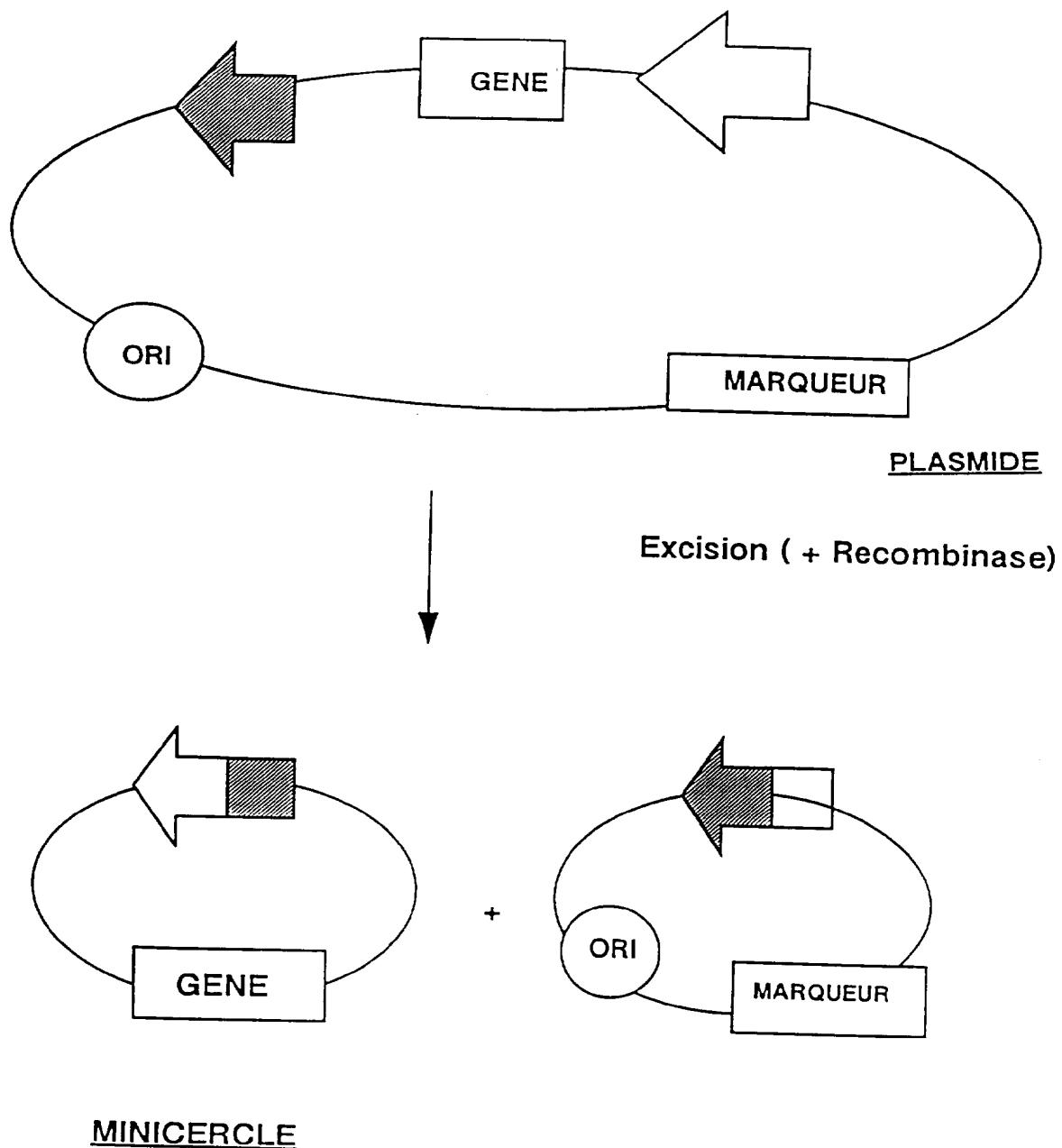
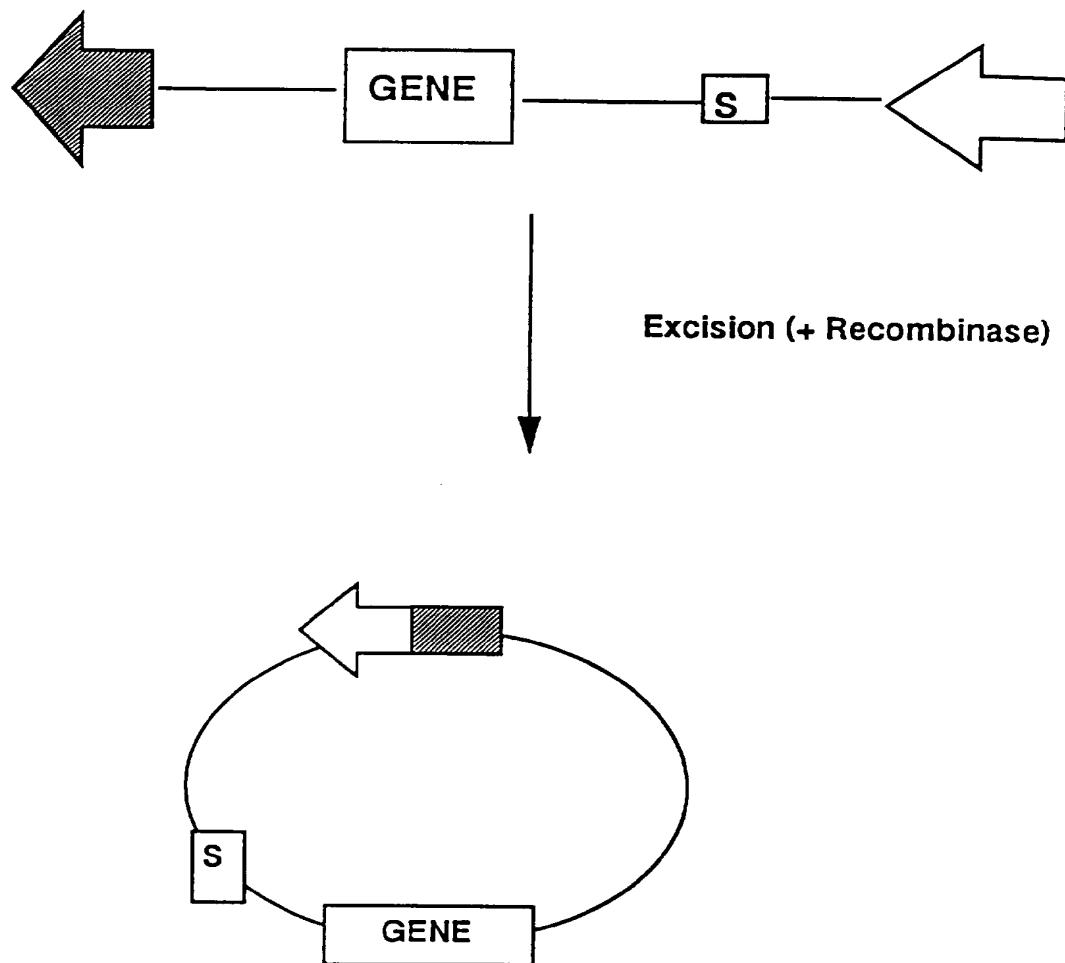


Figure 2

3/11

**GENE**

Gene d'intérêt

SSéquence Ligand-
spécifique**Figure 3**

4/11

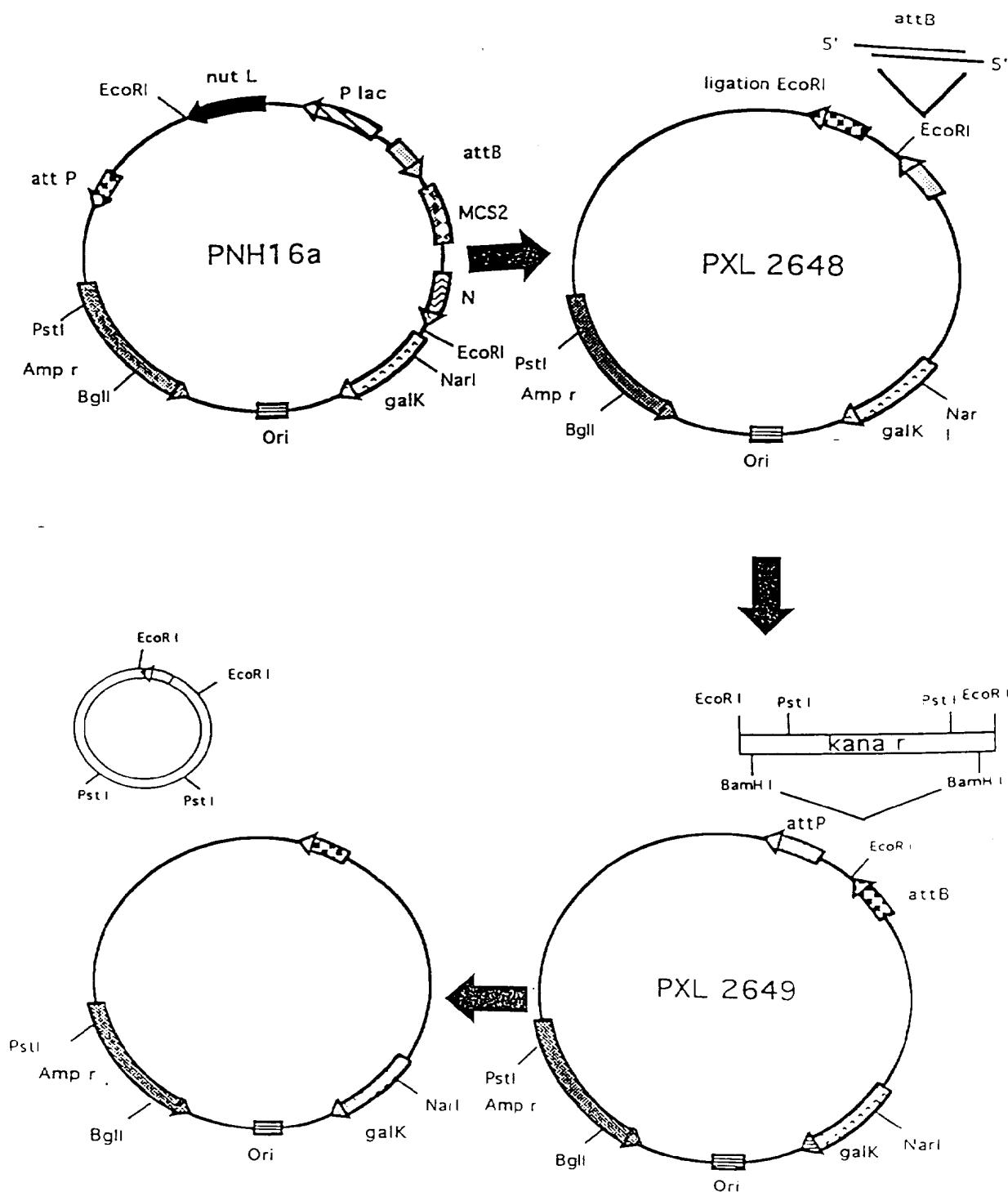


Figure 4

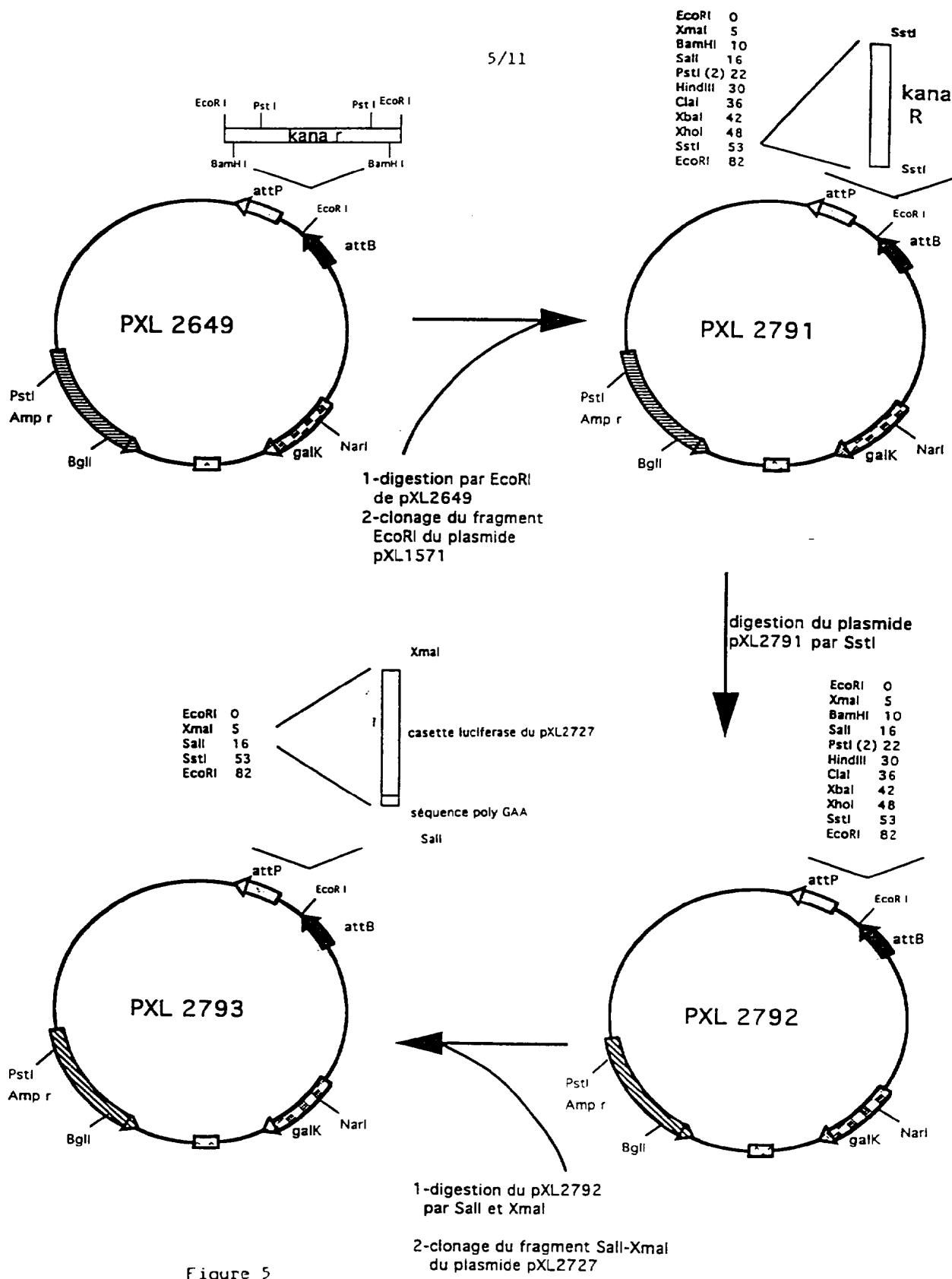


Figure 5

Activité luciférase obtenue sur cellules
NIH 3T3

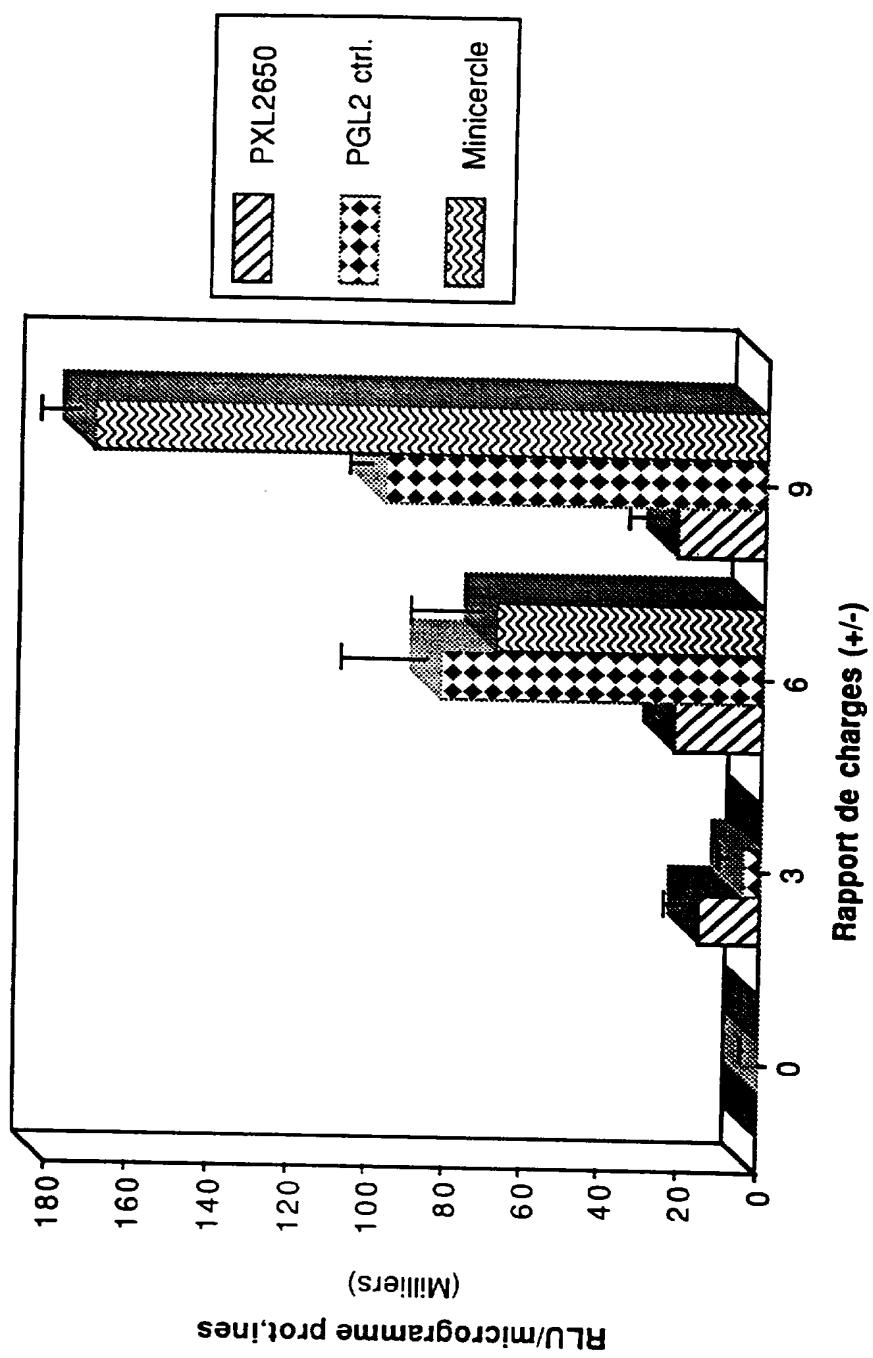


Figure 6

7 / 11

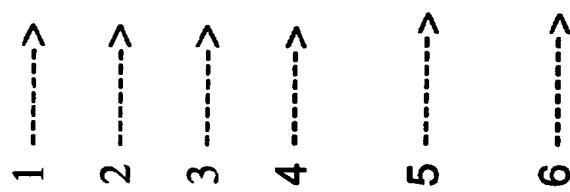
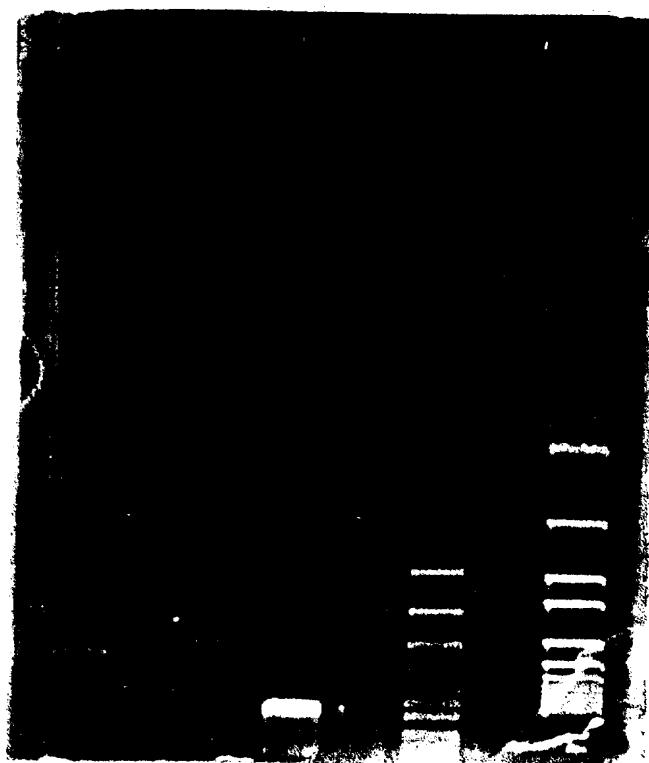


Figure 7

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

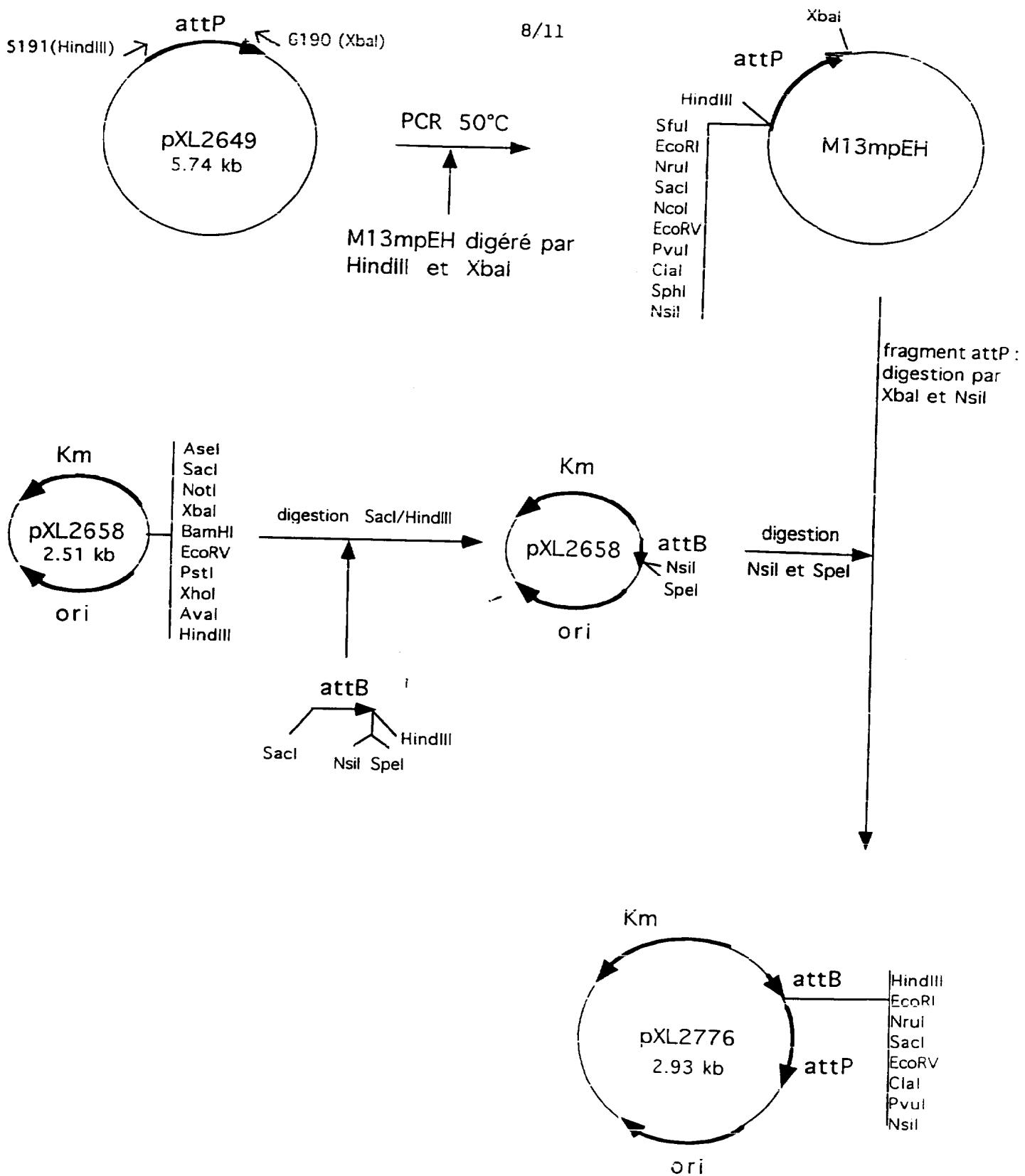


Figure 8

9/11

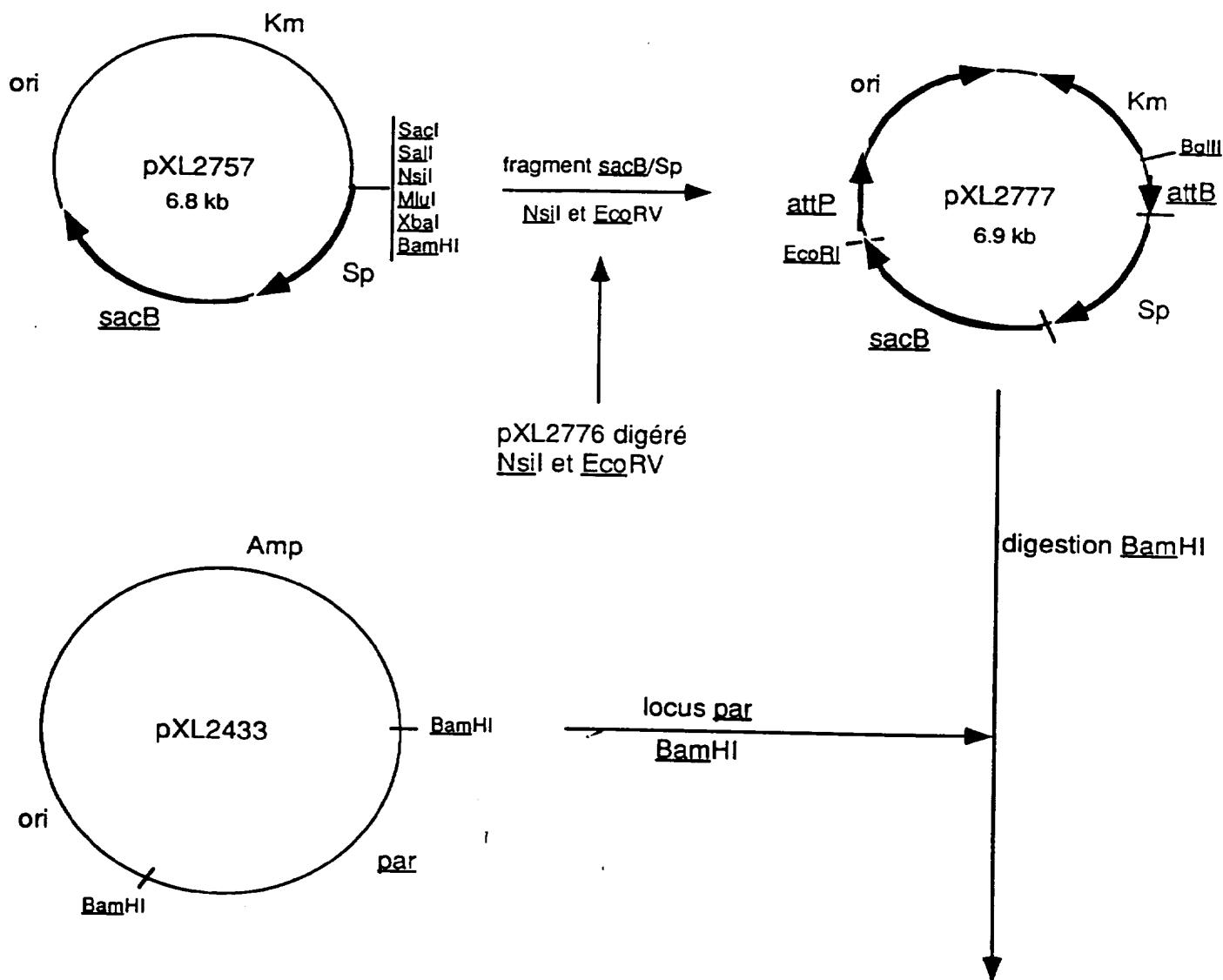
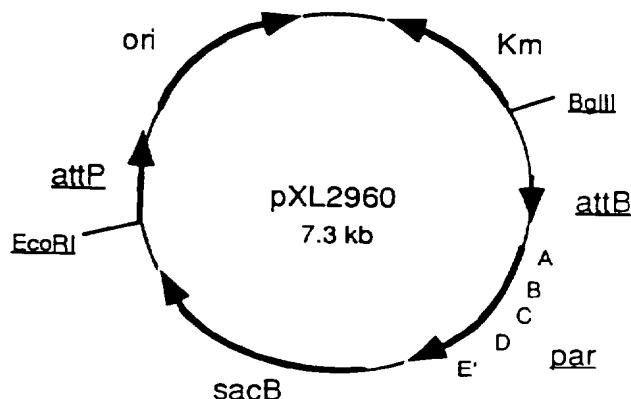


Figure 9



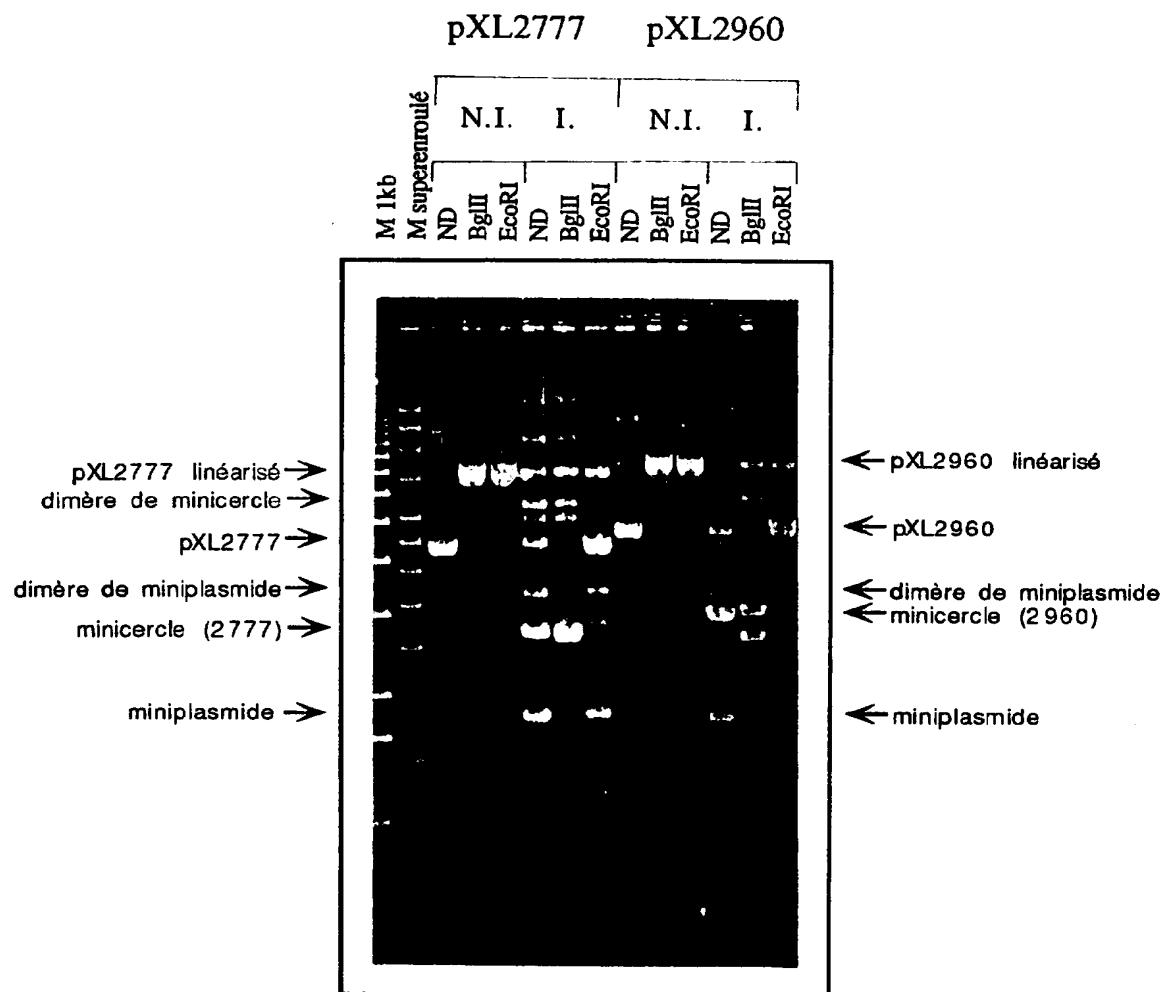


Figure 10

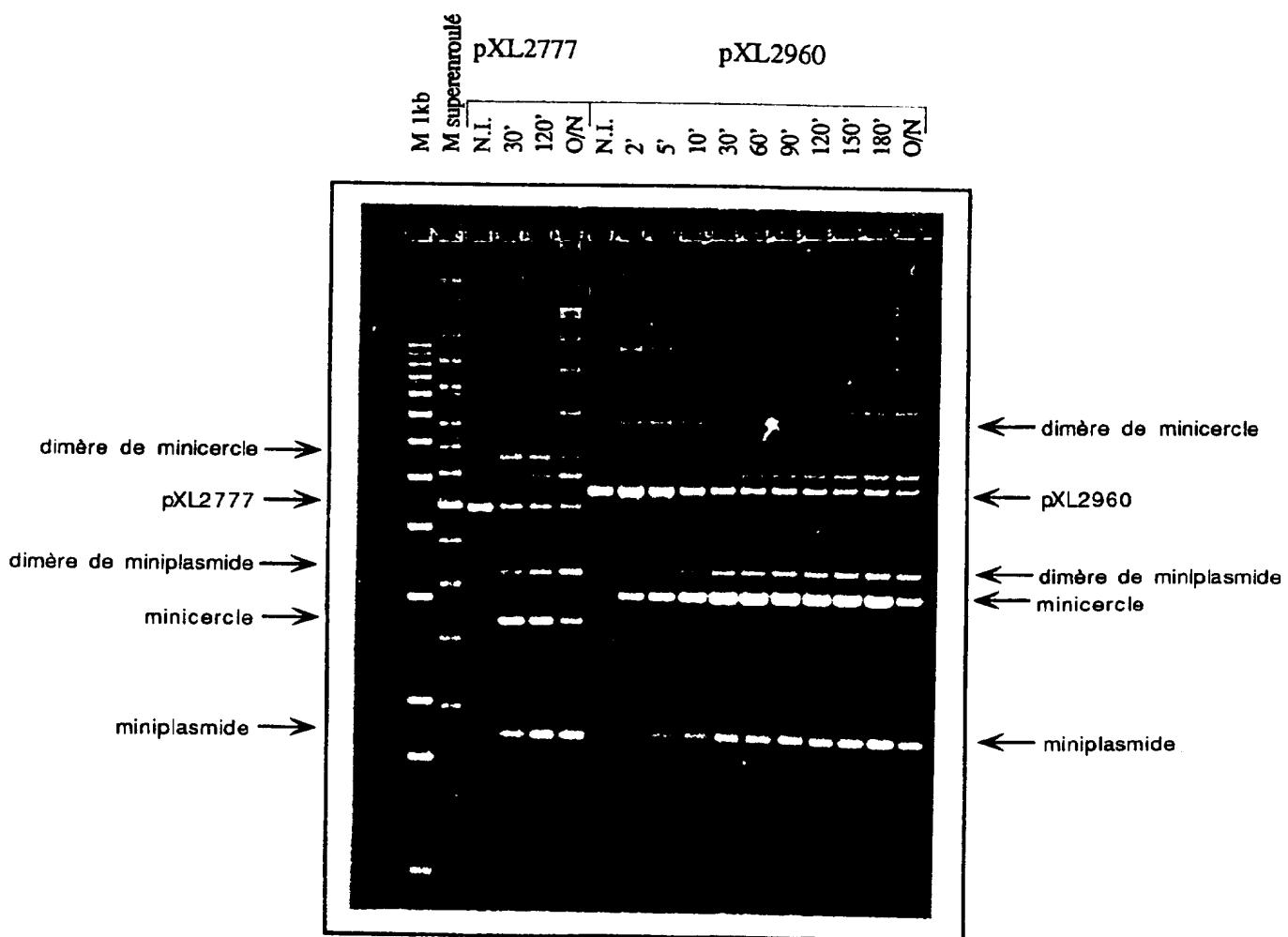


Figure 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 96/00274

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6	C12N15/10	C12N15/70	C12N15/85	C12N5/10	C12N1/21
	C12Q1/68	A61K31/70	A61K48/00	//(C12N1/21, C12R1:19)	

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N C12Q A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,94 09127 (US HEALTH) 28 April 1994	1,10-12, 38,42, 43,46
Y	see page 5, line 3 - line 14	2-7, 25-30, 47,48
Y	see page 9, line 13 - page 15, line 8; claims 1-18; figures 1-10 ---	2-5,26, 27,30, 47,48
Y	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 20, no. 21, 1992, IRL PRESS LIMITED, OXFORD, ENGLAND, pages 5853-5854, XP002005118 T. TAKABATAKE ET AL.: "The use of purine-rich oligonucleotides in triplex mediated DNA isolation and generation of unidirectional deletions" see the whole document ---	-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 June 1996

Date of mailing of the international search report

18.06.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 96/00274

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PROC. NATL.ACAD SCI., vol. 89, no. 2, 15 January 1992, NATL. ACAD SCI., WASHINGTON, DC, US;, pages 495-498, XP002005119 T. ITO ET AL.: "Sequence-specific DNA purification by triplex affinity capture" see the whole document ---	2-5, 26, 27, 30, 47, 48
Y	MOLECULAR MICROBIOL., vol. 12, no. 1, 1994, BLACKWELL, OXFORD, GB, pages 131-141, XP002005120 L. EBERL ET AL.: "Analysis of the multimer resolution system encoded by the parCBA operon of broad-host-range plasmid RP4" cited in the application see the whole document ---	6, 7, 25, 28, 29
A	BIO/TECHNOLOGY, vol. 2, no. 12, December 1984, NATURE PUBL. CO., NEW YORK, US, pages 1045-1049, XP002005121 K. BACKMAN ET AL.: "Use of synchronous site-specific recombination in vivo to regulate gene expression" see page 1045, left-hand column, line 1 - page 1049, left-hand column, line 19 ---	1-48
A	US,A,5 227 288 (BLATTNER FREDERICK R) 13 July 1993 see column 1, line 12 - column 14, line 16; claims 1-26; figure 1 ---	1-48
A	EP,A,0 300 422 (DU PONT) 25 January 1989 see the whole document ---	1-48
A	GENE, vol. 56, 1987, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS,B.V., AMSTERDAM, NL;, page 145-151 XP002005122 N. HASAN AND W. SZYBALSKI: "Control of cloned gene expression by promoter inversion in vivo: construction of improved vectors with a multiple cloning site and the ptac promoter" cited in the application see the whole document ---	1-48
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 96/00274

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J. BIOL. CHEM. (1994), 269(18), 13511-21 CODEN: JBCHA3; ISSN: 0021-9258, 1994, XP002005123 SU, TIN TIN ET AL: "Selective binding of Escherichia coli RNA polymerase to topoisomers of minicircles carrying the TAC16 and TAC17 promoters" see the whole document ---	1-48
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 13, no. 4, 1985, IRL PRESS LIMITED, OXFORD, ENGLAND, pages 1193-1208, XP002005124 M. MIZUUCHI AND K. MIZUUCHI: "The extent of DNA sequence requirement for a functional bacterial attachment site of phage labda" see the whole document	1-48
A	TRENDS IN GENETICS, vol. 8, no. 12, December 1992, ELSEVIER SCIENCE LTD., AMSTERDAM, NL, pages 432-439, XP002005125 W. M. STARK ET AL.: "Catalysis by site-specific recombinases" cited in the application see the whole document	1-48
A	EP,A,0 350 341 (CENTRE NAT RECH SCIENT) 10 January 1990 cited in the application see the whole document	1-48
E	WO,A,96 05297 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH ;SEEBER STEFAN (DE); RUEGER RUEDIGER (DE)) 22 February 1996 see the whole document	1,8-24, 32-34, 37-46
T	US,A,5 401 632 (WANG RENFENG ET AL) 28 March 1995 see the whole document	6-9, 13-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 96/00274

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9409127	28-04-94	AU-B-	5405994	09-05-94
US-A-5227288	13-07-93	NONE		
EP-A-0300422	25-01-89	AU-B-	610608	23-05-91
		AU-B-	1920188	27-01-89
		DE-A-	3876327	14-01-93
		JP-A-	1112986	01-05-89
EP-A-0350341	10-01-90	FR-A-	2631634	24-11-89
		AT-T-	122399	15-05-95
		DE-D-	68922533	14-06-95
		DE-T-	68922533	19-10-95
		ES-T-	2073451	16-08-95
		JP-A-	2069185	08-03-90
WO-A-9605297	22-02-96	DE-A-	4428402	15-02-96
US-A-5401632	28-03-95	NONE		

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Recherche internationale No
PCT/FR 96/00274

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6	C12N15/10	C12N15/70	C12N15/85	C12N5/10	C12N1/21
	C12Q1/68	A61K31/70	A61K48/00	//(C12N1/21,C12R1:19)	

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C12N C12Q A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO,A,94 09127 (US HEALTH) 28 Avril 1994	1,10-12, 38,42,
Y	voir page 5, ligne 3 - ligne 14	43,46 2-7, 25-30, 47,48
Y	voir page 9, ligne 13 - page 15, ligne 8; revendications 1-18; figures 1-10 --- NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 20, no. 21, 1992, IRL PRESS LIMITED, OXFORD, ENGLAND, pages 5853-5854, XP002005118 T. TAKABATAKE ET AL.: "The use of purine-rich oligonucleotides in triplex mediated DNA isolation and generation of unidirectional deletions" voir le document en entier ---	2-5,26, 27,30, 47,48
	-/-	

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:	
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent	"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date	"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)	"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens	"&" document qui fait partie de la même famille de brevets
"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée	

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
10 Juin 1996	18.06.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentiaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hornig, H

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Internationale No
PCT/FR 96/00274

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications vistes
Y	PROC. NATL.ACAD SCI., vol. 89, no. 2, 15 Janvier 1992, NATL. ACAD SCI., WASHINGTON, DC, US;, pages 495-498, XP002005119 T. ITO ET AL.: "Sequence-specific DNA purification by triplex affinity capture" voir le document en entier ---	2-5, 26, 27, 30, 47, 48
Y	MOLECULAR MICROBIOL., vol. 12, no. 1, 1994, BLACKWELL, OXFORD, GB, pages 131-141, XP002005120 L. EBERL ET AL.: "Analysis of the multimer resolution system encoded by the parCBA operon of broad-host-range plasmid RP4" cité dans la demande voir le document en entier ---	6, 7, 25, 28, 29
A	BIO/TECHNOLOGY, vol. 2, no. 12, Décembre 1984, NATURE PUBL. CO., NEW YORK, US, pages 1045-1049, XP002005121 K. BACKMAN ET AL.: "Use of synchronous site-specific recombination in vivo to regulate gene expression" voir page 1045, colonne de gauche, ligne 1 - page 1049, colonne de gauche, ligne 19 ---	1-48
A	US,A,5 227 288 (BLATTNER FREDERICK R) 13 Juillet 1993 voir colonne 1, ligne 12 - colonne 14, ligne 16; revendications 1-26; figure 1 ---	1-48
A	EP,A,0 300 422 (DU PONT) 25 Janvier 1989 voir le document en entier ---	1-48
A	GENE, vol. 56, 1987, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS,B.V., AMSTERDAM, NL;, page 145-151 XP002005122 N. HASAN AND W. SZYBALSKI: "Control of cloned gene expression by promoter inversion in vivo: construction of improved vectors with a multiple cloning site and the ptac promoter" cité dans la demande voir le document en entier ---	1-48
	-/-	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

PCT/FR 96/00274

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	J. BIOL. CHEM. (1994), 269(18), 13511-21 CODEN: JBCHA3; ISSN: 0021-9258, 1994, XP002005123 SU, TIN TIN ET AL: "Selective binding of Escherichia coli RNA polymerase to topoisomers of minicircles carrying the TAC16 and TAC17 promoters" voir le document en entier ---	1-48
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 13, no. 4, 1985, IRL PRESS LIMITED, OXFORD, ENGLAND, pages 1193-1208, XP002005124 M. MIZUUCHI AND K. MIZUUCHI: "The extent of DNA sequence requirement for a functional bacterial attachment site of phage labda" voir le document en entier ---	1-48
A	TRENDS IN GENETICS, vol. 8, no. 12, Décembre 1992, ELSEVIER SCIENCE LTD., AMSTERDAM, NL, pages 432-439, XP002005125 W. M. STARK ET AL.: "Catalysis by site-specific recombinases" cité dans la demande voir le document en entier ---	1-48
A	EP,A,0 350 341 (CENTRE NAT RECH SCIENT) 10 Janvier 1990 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-48
E	WO,A,96 05297 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH ;SEEBER STEFAN (DE); RUEGER RUEDIGER (DE)) 22 Février 1996 voir le document en entier ---	1,8-24, 32-34, 37-46
T	US,A,5 401 632 (WANG RENFENG ET AL) 28 Mars 1995 voir le document en entier -----	6-9, 13-19

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

PCT/FR 96/00274

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication	
WO-A-9409127	28-04-94	AU-B-	5405994	09-05-94
US-A-5227288	13-07-93	AUCUN		
EP-A-0300422	25-01-89	AU-B- AU-B- DE-A- JP-A-	610608 1920188 3876327 1112986	23-05-91 27-01-89 14-01-93 01-05-89
EP-A-0350341	10-01-90	FR-A- AT-T- DE-D- DE-T- ES-T- JP-A-	2631634 122399 68922533 68922533 2073451 2069185	24-11-89 15-05-95 14-06-95 19-10-95 16-08-95 08-03-90
WO-A-9605297	22-02-96	DE-A-	4428402	15-02-96
US-A-5401632	28-03-95	AUCUN		